



DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, ANATOMÍA Y BIOLOGÍA CELULAR  
UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE

# **MECANISMOS CELULARES QUE SUBYACEN A LA ‘SPIKE TIMING- DEPENDENT PLASTICITY’**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
CON MENCIÓN INTERNACIONAL

**PRESENTADA POR PALOMA DUQUE FERIA**  
**DIRECTOR: Dr. ANTONIO RODRÍGUEZ MORENO**

**SEVILLA, DICIEMBRE 2015**



DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, ANATOMÍA Y BIOLOGÍA CELULAR  
UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE

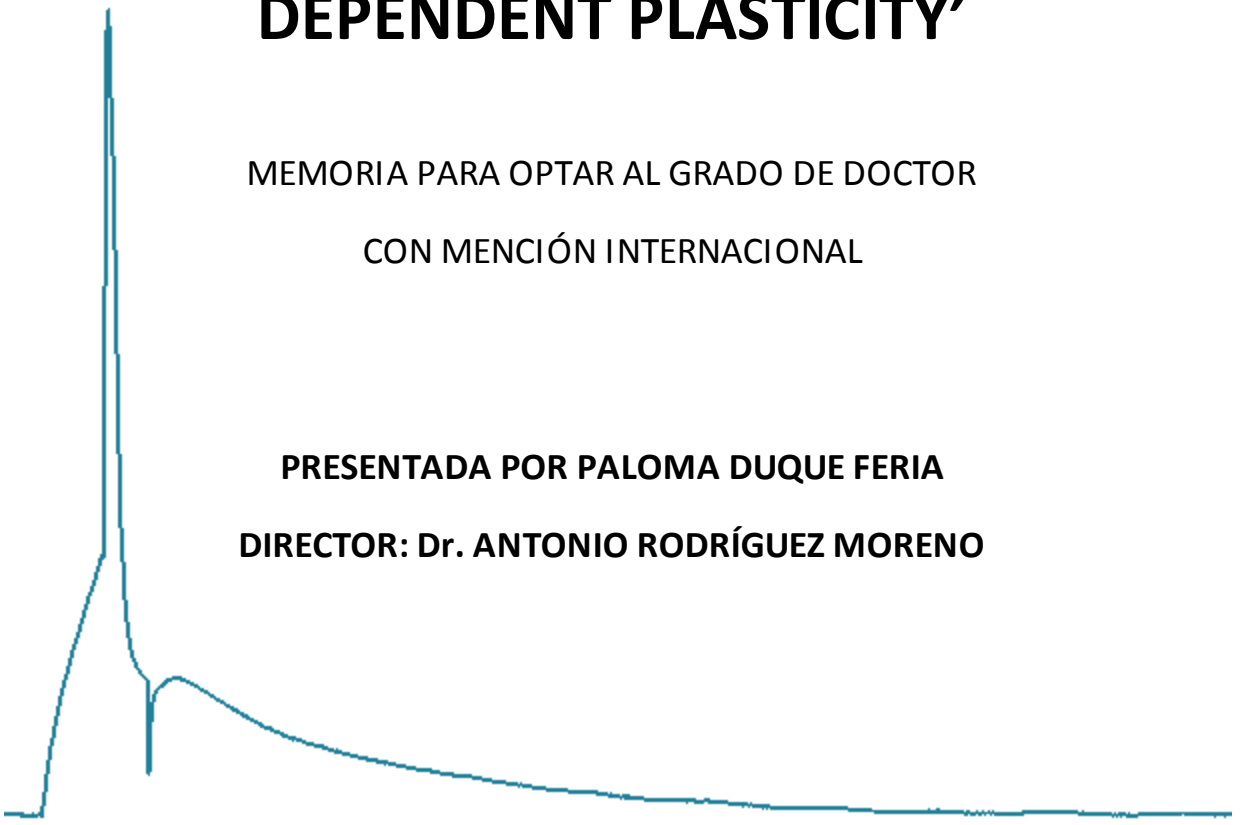
# **MECANISMOS CELULARES QUE SUBYACEN A LA 'SPIKE TIMING- DEPENDENT PLASTICITY'**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

CON MENCIÓN INTERNACIONAL

PRESENTADA POR PALOMA DUQUE FERIA

DIRECTOR: Dr. ANTONIO RODRÍGUEZ MORENO



SEVILLA, DICIEMBRE 2015



DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, ANATOMÍA Y BIOLOGÍA CELULAR  
UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE

Memoria para optar al grado de Doctor con Mención Internacional por la Universidad Pablo de Olavide. Presentada por **PALOMA DUQUE FERIA**. Realizada en la Universidad Pablo de Olavide, Departamento de Fisiología, Anatomía y Biología Celular, Laboratorio de Neurociencia Celular y Plasticidad; bajo la dirección del **Dr. Antonio Rodríguez Moreno**.

VºBº del Director de la Tesis  
**Dr. Antonio Rodríguez Moreno**

La doctoranda,  
**Dña. Paloma Duque Feria**



DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, ANATOMÍA Y BIOLOGÍA CELULAR  
UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE

D. Antonio Rodríguez Moreno, Profesor Titular de la Universidad Pablo de Olavide,

INFORMA

Que Dña. Paloma Duque Feria, con DNI 75.559.785R, ha realizado con total aprovechamiento y bajo su dirección los trabajos de investigación recogidos en esta memoria, titulada "Mecanismos celulares que subyacen a la 'Spike timing-dependent plasticity'", para optar al grado de Doctor con Mención Internacional

Y para que así conste, firma el presente Informe en Sevilla, España, diciembre de 2015.

Dr. Antonio Rodríguez Moreno  
Departamento de Fisiología, Anatomía y Biología Celular  
Universidad Pablo de Olavide

*A mi familia...*

*a la que me unen lazos de sangre y a la elegida.*

## Abstract (English)

Spike timing-dependent plasticity (STDP) is a Hebbian learning rule important for synaptic refinement during development and for learning and memory in the adult. Given its importance in memory, surprisingly little is known about the rules and roles of STDP in the hippocampus. In the present doctoral thesis, the minimum requirements for induction of hippocampal spike timing-dependent long-term potentiation (t-LTP) and spike timing-dependent long-term depression (t-LTD) and the mechanisms of these two forms of plasticity at CA3-CA1 synapses in young (P12-P18) mouse hippocampus were investigated using whole-cell recordings. It was found that both t-LTP and t-LTD can be induced at hippocampal CA3-CA1 synapses by pairing presynaptic activity with single postsynaptic action potentials at low stimulation frequency (0.2 Hz). Both t-LTP and t-LTD require NMDA-type glutamate receptors for their induction, but the location and properties of these receptors are different: While t-LTP requires postsynaptic NMDA receptors, t-LTD does not, and whereas t-LTP is blocked by antagonists at GluN2A and GluN2B subunit-containing NMDA receptors, t-LTD is blocked by antagonists at NMDA receptors containing GluN2C or GluN2D subunits. Both t-LTP and t-LTD require postsynaptic calcium for their induction. Induction of t-LTD requires calcium influx through L-type voltage-dependent calcium channels and calcium release from internal stores initiated by the activation of mGlu5 type glutamate receptors, as well as endocannabinoid (eCB) synthesis, release and activation of CB1 receptors. Timing-dependent LTD is expressed presynaptically as indicated by fluctuation analysis, failure rate and paired-pulse ratio. The results show that CA3-CA1 synapses display both NMDA receptor-dependent t-LTP and t-LTD during development and identify a presynaptic form of hippocampal t-LTD involved in the refinement of synapses.

## Abstract (Español)

La Spike timing-dependent plasticity (STDP) es una regla Hebbiana de aprendizaje involucrada en el refinamiento de las sinapsis durante el desarrollo y en procesos de aprendizaje y memoria en adultos. Dada su importancia en dichos procesos, es sorprendente lo poco que se conoce sobre el papel y las reglas que gobiernan la STDP en el hipocampo. En la presente tesis doctoral se investigaron los requerimientos mínimos para la inducción de la potenciación y la depresión de larga duración dependientes de la coincidencia temporal entre la actividad pre y postsináptica (t-LTP y t-LTD respectivamente, del inglés *timing-dependent long-term potentiation* y *timing-dependent long-term depression*), así como los mecanismos celulares que subyacen a estas dos formas de plasticidad en las sinapsis establecida entre las colaterales de Schaffer de las neuronas de CA3 y las células piramidales de CA1 (CA3-CA1) en el hipocampo de ratones juveniles (P12-P18). Para ello, se utilizó la técnica de patch clamp en su configuración de célula completa. Se encontró que tanto la t-LTP como la t-LTD pueden inducirse en dicha sinapsis mediante el pareamiento de la actividad presináptica con un único potencial de acción postsináptico a baja frecuencia de estimulación (0.2 Hz). Tanto la t-LTP como la t-LTD requieren receptores de glutamato de tipo NMDA para su inducción, pero la localización y las propiedades de dichos receptores son diferentes: la t-LTP requiere receptores de tipo NMDA postsinápticos, pero no la t-LTD; y mientras que la t-LTP requiere receptores de tipo NMDA que contienen la subunidades GluN2A y GluN2B, la t-LTD requiere receptores de tipo NMDA que contienen las subunidades GluN2C y/o GluN2D. Tanto la t-LTP como la t-LTD requieren entrada de calcio postsináptico para su inducción. La t-LTD requiere la entrada de calcio a través de canales de calcio dependientes de voltaje de tipo L, así como la liberación de calcio desde los reservorios intracelulares. Dicha liberación está mediada por la activación de receptores metabotrópicos de glutamato de tipo 5 (mGlu5). La inducción de la t-LTD requiere además la síntesis y liberación de endocannabinoides, así como la activación de receptores cannabinoides CB1. Tal como indican los análisis de las fluctuaciones de las respuestas, del número de fallos y del ratio por pares de pulsos, la t-LTD se expresa presinápticamente. Estos resultados muestran que la sinapsis CA3-CA1 exhibe tanto t-LTP como t-LTD dependientes de receptores de tipo NMDA durante el desarrollo y la identificación de una forma de LTD hipocampal presináptica involucrada en el refinamiento de las sinapsis.

## Abreviaturas

ABC	dominio de unión del agonista
AC	adenilato ciclasa
AMPA	ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico
AMPc	adenosín monofosfato cíclico
AP	potencial de acción
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
bAP	propagación hacia atrás del potencial de acción
BAPTA	ácido 1,2-bis(2-aminofenoxi)etano-n,n,n',n'-tetraacético
CA	<i>Cornu Ammonis</i>
Ca <sup>2+</sup>	ión calcio
CA3-CA1	sinapsis establecida entre las colaterales de Schaffer de las neuronas de CA3 y las neuronas piramidales del área de CA1
CaMKII	complejo calcio calmodulina proteína quinasa II
CB1	receptores cannabinoides de tipo 1
CO <sub>2</sub>	dióxido de carbono
CTD	dominio C-terminal
CV	coeficiente de variación
DAG	diacilglicerol
D-AP5	ácido D-2-amino-5-fosofopentanoico
DG	giro dentado
DMSO	dimetilsulfóxido
E	día embrionario



---

EC	corteza entorrinal
eCB	endocannabinoide
EEM	error estándar de la media
EPSPs	potenciales postsinápticos provocados
Fig.	figura
G	gramo
Glu	glutamato
Hz	Hercio
IC <sub>50</sub>	concentración inhibitoria máxima media
iGluR	receptor ionotrópico de glutamato
IP <sub>3</sub>	inosito trifosfato
IP <sub>3</sub> R	receptores IP <sub>3</sub>
K <sup>+</sup>	ión potasio
KHz	Kilohercio
L	litro
LTD	depresión de larga duración
LTP	potenciación de larga duración
mEPSC	corrientes postsinápticas excitadoras miniatura
mg	miligramo
Mg <sup>2+</sup>	ión magnesio
mGlu5	receptor metabotrópico de glutamato de tipo 5
mGluR	receptor metabotrópico de glutamato
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar

ms	milisegundo
mV	milivoltio
MΩ	megaohmios
Na <sup>+</sup>	ión sodio
NMDA	ácido N-metil-D-aspartico
nM	nanomolar
NO	óxido nítrico
NTD	dominio N-terminal
O <sub>2</sub>	oxígeno
P	día postnatal
pCa/pCs	ratio entre la permeabilidad del Calcio y la permeabilidad del Cesio
PIP <sub>2</sub>	inositol difosfato
PKA	proteína Quinasa A
PKC	proteína Quinasa C
PLC	fosfolipasa C
Post-pre	protocolo de pareamiento en el cual el potencial de acción postsináptico fue provocado 12 ms antes del inicio del EPSP
PP1	proteína Fosfatasa 1
PPD	depresión por pares de pulsos
PPF	facilitación por pares de pulsos
PPR	ratio de las respuestas por pares de pulsos
Pr	probabilidad de liberación
Pre-post	protocolo de pareamiento en el cual el potencial de acción postsináptico fue provocado 10 ms después del inicio del EPSP
pS	picosiemens

R	electrodo de registro
s	segundo
S	electrodo de estimulación
SNC	Sistema Nervioso Central
STDP	Spike timing-dependent plasticity
STP	Plasticidad de corta duración
t-LTD	depresión de larga duración dependiente de la coincidencia temporal de la actividad pre y postsináptica
t-LTP	potenciación de larga duración dependiente de la coincidencia temporal de la actividad pre y postsináptica
THL	tetrahydrolipstatina
TMD	dominio transmembrana
VDCC	canales de calcio dependientes de voltaje
Zn <sup>2+</sup>	ión zinc
$\Delta t$	intervalo temporal
$\mu\text{M}$	micromolar
°C	grado centigrade
$\tau$	tiempo de caída

# Índice

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1. EL HIPOCAMPO</b>	<b>4</b>
1.1 NEUROANATOMÍA DEL HIPOCAMPO	7
1.2 LA SINAPSIS ESTABLECIDA ENTRE LAS COLATERALES DE SCHAFER (CA3) Y LAS CÉLULAS PIRAMIDALES DE LA REGIÓN DE CA1	9
<b>2. PLASTICIDAD SINÁPTICA</b>	<b>11</b>
2.1 DIFERENTES TIPOS DE PLASTICIDAD SINÁPTICA	12
2.1.1 PLASTICIDAD DE CORTA DURACIÓN	13
2.1.1.1 Ratio por pares de pulsos	13
2.1.2 PLASTICIDAD DE LARGA DURACIÓN	14
2.2 PLASTICIDAD SINÁPTICA EN EL HIPOCAMPO (SINAPSIS CA3-CA1)	17
2.3 SPIKE TIMING-DEPENDENT PLASTICITY	20
<b>3. RECEPTORES DE GLUTAMATO DE TIPO NMDA</b>	<b>25</b>
3.1 RECEPTORES DE GLUTAMATO	25
3.2 PROPIEDADES MOLECULARES Y BIOFÍSICAS DE LOS RECEPTORES DE TIPO NMDA	27
3.2.1 FAMILIAS DE SUBUNIDADES: GLUN1, GLUN2 Y GLUN3	28
3.2.2 DIVERSIDAD ESTRUCTURAL DE LOS RECEPTORES DE TIPO NMDA	31
3.3 PROPIEDADES BIOFÍSICAS DE LOS RECEPTORES DE TIPO NMDA	33
3.4 MODULADORES ENDÓGENOS DE LOS RECEPTORES DE TIPO NMDA	35
3.5 RECEPTORES DE TIPO NMDA PRESINÁPTICOS IMPLICADOS EN PLASTICIDAD	37
<b>II. OBJETIVOS</b>	<b>40</b>
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>43</b>
<b>1. ANIMALES</b>	<b>45</b>
<b>2. OBTENCIÓN DEL TEJIDO</b>	<b>46</b>

<b>3. REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS .....</b>	<b>47</b>
<b>3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>47</b>
<b>3.2 REGISTRO DE POTENCIALES POSTSINÁPTICOS</b>	
<b>EXCITADORES PROVOCADOS.....</b>	<b>48</b>
<b>4. PROTOCOLOS EMPLEADOS EN LOS EXPERIMENTOS .....</b>	<b>51</b>
<b>4.1 PROTOCOLOS PARA INDUCIR SPIKE TIMING-DEPENDENT</b>	
<b>PLASTICITY .....</b>	<b>51</b>
<b>4.2 PROTOCOLO DE ESTIMULACIÓN POR PARES DE PULSOS.....</b>	<b>51</b>
<b>5. ANÁLISIS DE DATOS .....</b>	<b>52</b>
<b>6. FARMACOLOGÍA .....</b>	<b>53</b>
<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>55</b>
<b>1. INDUCCIÓN Y PERFIL DE DESARROLLO DE LA SPIKE</b>	
<b>TIMING-DEPENDENT PLASTICITY (STDP).....</b>	<b>57</b>
<b>1.1 INDUCCIÓN DE LA STDP EN LA SINAPSIS ESTABLECIDA</b>	
<b>ENTRE LAS COLATERALES DE SCHAFER Y LAS CÉLULAS</b>	
<b>PIRAMIDALES DE CA1 EN EL HIPOCAMPO DE RATÓN.....</b>	<b>58</b>
1.1.1 EL PROTOCOLO PRE-POST INDUCE t-LTP.....	58
1.1.2 EL PROTOCOLO POST-PRE INDUCE t-LTD .....	60
<b>1.2 PERFIL DE DESARROLLO DE LA STDP EN LA SINAPSIS</b>	
<b>ESTABLECIDA ENTRE LAS COLATERALES DE SCHAFER Y</b>	
<b>LAS CÉLULAS PIRAMIDALES DE CA1 EN EL HIPOCAMPO DE RATÓN.....</b>	<b>60</b>
1.2.1 PERFIL DE DESARROLLO DE LA t-LTP .....	62
1.2.2 PERFIL DE DESARROLLO DE LA t-LTD.....	62
<b>2. PAPEL DE LOS RECEPTORES DE TIPO NMDA EN LA STDP .....</b>	<b>68</b>
<b>2.1 DEPENDENCIA DE LA STDP DE RECEPTORES DE TIPO NMDA</b>	
<b>EN LA SINAPSIS ESTABLECIDA ENTRE LAS COLATERALES DE</b>	
<b>SCHAFER Y LAS CÉLULAS PIRAMIDALES DE CA1 EN EL</b>	
<b>HIPOCAMPO DE RATÓN.....</b>	<b>68</b>
2.1.1 LA INDUCCIÓN DE LA t-LTP ES DEPENDIENTE DE	
RECEPTORES DE TIPO NMDA.....	69

2.1.2 LA INDUCCIÓN DE LA t-LTD ES DEPENDIENTE DE RECEPTORES DE TIPO NMDA.....	69
<b>2.2 LOCALIZACIÓN DE LOS RECEPTORES DE TIPO NMDA EN LA STDP .....</b>	<b>72</b>
2.2.1 LA t-LTP REQUIERE DE LA ACTIVACIÓN DE RECEPTORES DE TIPO NMDA POSTSINÁPTICOS.....	72
2.2.2 LA t-LTD REQUIERE DE LA ACTIVACIÓN DE RECEPTORES DE TIPO NMDA NO POSTSINÁPTICOS .....	72
2.2.3 LA EXPRESIÓN DE LA t-LTD ES PRESINÁPTICA.....	75
<b>2.3 DIFERENTE COMPOSICIÓN EN SUBUNIDADES DE LOS RECEPTORES DE TIPO NMDA NECESARIOS PARA LA INDUCCIÓN DE LA STDP .....</b>	<b>77</b>
2.3.1 LA t-LTP PERO NO LA t-LTD ES DEPENDIENTE DE RECEPTORES DE TIPO NMDA QUE CONTIENEN LA SUBUNIDAD GLUN2A.....	77
2.3.2 LA t-LTP PERO NO LA t-LTD ES DEPENDIENTE DE RECEPTORES DE TIPO NMDA QUE CONTIENEN LA SUBUNIDAD GLUN2B.....	79
<b>3. REQUERIMIENTOS DE CALCIO Y OTROS RECEPTORES IMPLICADOS EN LA t-LTD.....</b>	<b>88</b>
<b>3.1 REQUERIMIENTOS DE CALCIO EN LA t-LTD .....</b>	<b>88</b>
3.1.1 TANTO LA t-LTP COMO LA t-LTD REQUIEREN DE CALCIO POSTSINÁPTICO PARA SU INDUCCIÓN .....	88
3.1.2 LA t-LTD REQUIERE DE LA ENTRADA DE CALCIO POSTSINÁPTICO A TRAVÉS DE LOS CANALES DE CALCIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE DE TIPO L, ASÍ COMO SU LIBERACIÓN DESDE LOS RESERVORIOS INTRACELULARES.....	89
<b>3.2 LA t-LTD REQUIERE DE LA ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES METABOTRÓPICOS DE GLUTAMATO DE TIPO 5 .....</b>	<b>91</b>
<b>3.3 LA t-LTD REQUIERE DE LA SÍNTESIS Y LIBERACIÓN POSTSINÁPTICA DE ENDOCANNABINOIDES (eCBs) Y LA ACTIVACIÓN DE RECEPTORES CANNABINOIDES DE TIPO I (CB1).....</b>	<b>94</b>

---

<b>V. DISCUSIÓN .....</b>	<b>96</b>
<b>1. STDP EN LA SINAPSIS SC-CA1 Y SU PERFIL DE DESARROLLO.....</b>	<b>100</b>
<b>2. LOCALIZACIÓN DE LOS RECEPTORES DE TIPO NMDA EN LA STDP .....</b>	<b>100</b>
<b>3. POSIBLES RECEPTORES PRESINÁPTICOS DE TIPO NMDA EN EL HIPOCAMPO .....</b>	<b>101</b>
<b>4. LA t-LTD SE EXPRESA PRESINÁPTICAMENTE EN LA SINAPSIS HIPOCAMPAL CA3-CA1 .....</b>	<b>102</b>
<b>5. COMPOSICIÓN EN SUBUNIDADES DE LOS RECEPTORES DE TIPO NMDA EN LA SPIKE TIMING-DEPENDENT PLASTICITY.....</b>	<b>103</b>
<b>6. REQUERIMIENTOS DE CALCIO DE LA t-LTP Y LA t-LTD Y PAPEL DE LOS RECEPTORES mGlu5 .....</b>	<b>105</b>
<b>7. RECEPTORES CANNABINOIDES EN LA t-LTD .....</b>	<b>106</b>
<b>8. ¿CUÁL ES EL PAPEL FISIOLÓGICO DE ESTA FORMA DE PLASTICIDAD SINÁPTICA ? .....</b>	<b>106</b>
<b>VI. CONCLUSIONES .....</b>	<b>108</b>
<b>Referencias bibliográficas .....</b>	<b>113</b>



## Lista de figuras

Figura 1.	Generalidades del hipocampo.....	4
Figura 2.	Conexiones en la formación hipocampal .....	8
Figura 3.	Circuito trisináptico del hipocampo.....	8
Figura 4.	Organización de las proyecciones desde la región de CA3 (Colaterales de Schaffer) hasta la región de CA1 del hipocampo .....	9
Figura 5.	Formas de LTP y LTD ampliamente estudiadas.....	16
Figura 6.	Forma de LTD dependiente de señalización mediada por eCBs .....	19
Figura 7.	Spike timing-dependent plasticity .....	22
Figura 8.	Cronografía de la Spike timing-dependent plasticity.....	24
Figura 9.	Clasificación de los receptores de Glutamato.....	26
Figura 10.	Diversidad estructural, en subunidades y expresión de los receptores de tipo NMDA .....	29
Figura 11.	Extracción del cerebro .....	45
Figura 12.	Preparación de rodajas .....	47
Figura 13.	Microscopio con los distintos elementos que hicieron posible la colocación de la rodaja y su mantenimiento, la sujeción de los electrodos y la localización de las zonas de estimulación y registro.....	48
Figura 14.	Equipamiento que hizo posible la realización de los experimentos .....	49
Figura 15.	Ubicación de los electrodos .....	50
Figura 16.	Diagrama de los protocolos utilizados para la inducción de STDP y curso temporal de los experimentos.....	52
Figura 17.	Inducción de t-LTP en la sinapsis CA3-CA1 .....	59
Figura 18.	Inducción de t-LTD en la sinapsis CA3-CA1 .....	61
Figura 19.	Perfil de desarrollo de la t-LTP en la sinapsis CA3-CA1 en el hipocampo de ratón .....	63
Figura 20.	Perfil de desarrollo de la t-LTD en la sinapsis CA3-CA1 en el hipocampo de ratón .....	64
Figura 21.	Cambio de t-LTD a t-LTP durante la cuarta semana de desarrollo tras la aplicación de un protocolo de apareamiento post-pre .....	65

Figura 22.	La t-LTP requiere de receptores de tipo NMDA .....	70
Figura 23.	La t-LTD requiere de receptores de tipo NMDA.....	71
Figura 24.	La t-LTP requiere de receptores de tipo NMDA postsinápticos.....	73
Figura 25.	La t-LTD no requiere de receptores de tipo NMDA postsinápticos. ....	74
Figura 26.	La t-LTD muestra una expresión presináptica .....	76
Figura 27.	La t-LTP requiere de receptores de tipo NMDA que contienen la subunidad GluN2A.....	78
Figura 28.	La t-LTD no requiere de receptores de tipo NMDA que contienen la subunidad GluN2A.....	80
Figura 29.	La t-LTP requiere de receptores de tipo NMDA que contienen la subunidad GluN2B .....	81
Figura 30.	La t-LTD no requiere de receptores de tipo NMDA que contienen la subunidad GluN2B .....	82
Figura 31.	La t-LTP no requiere de receptores de tipo NMDA que contienen la subunidad GluN2C/2D .....	84
Figura 32.	La t-LTD requiere de receptores de tipo NMDA que contienen la subunidad GluN2C/2D .....	85
Figura 33.	Composición en subunidades de los receptores de tipo NMDA necesarios para la inducción de la STDP .....	86
Figura 34.	Tanto la t-LTP como la t-LTD requieren de un aumento de los niveles de calcio citoplasmático postsináptico para su inducción.....	90
Figura 35.	Fuentes de calcio para la inducción de la t-LTD .....	92
Figura 36.	La t-LTD requiere de receptores metabotrópicos de glutamato de tipo 5 .....	93
Figura 37.	La t-LTD requiere de la activación de receptores de CB1.....	95
Figura 38.	Modelo del mecanismo de acción de la t-LTD en la sinapsis CA3-CA1 en el hipocampo de ratón .....	99
Tabla 1.	Composición de la solución extracelular .....	46
Tabla 2.	Composición de la solución interna.....	49

## II. Introducción

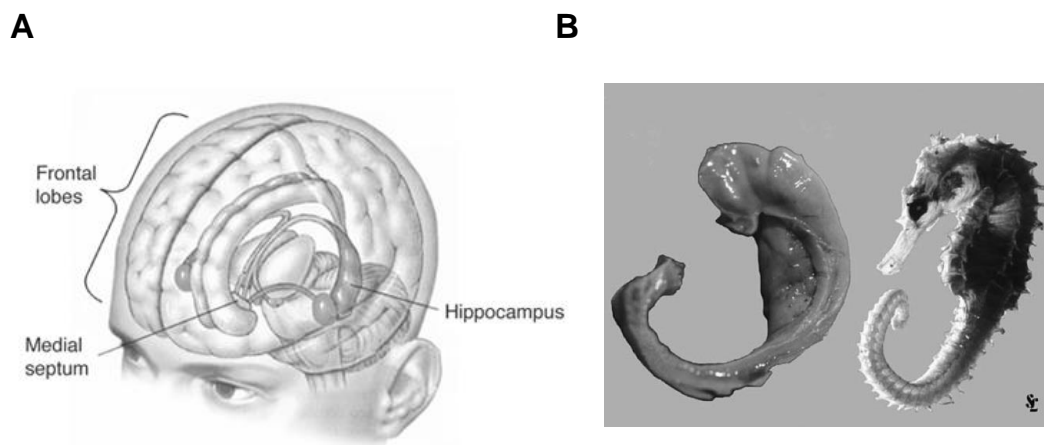
# I. INTRODUCCIÓN

<b>1. EL HIPOCAMPO .....</b>	<b>4</b>
<b>1.1 NEUROANATOMÍA DEL HIPOCAMPO .....</b>	<b>7</b>
<b>1.2 LA SINAPSIS ESTABLECIDA ENTRE LAS COLATERALES DE SCHAFER (CA3) Y LAS CÉLULAS PIRAMIDALES DE LA REGIÓN DE CA1 .....</b>	<b>9</b>
<b>2. PLASTICIDAD SINÁPTICA.....</b>	<b>11</b>
<b>2.1 DIFERENTES TIPOS DE PLASTICIDAD SINÁPTICA.....</b>	<b>12</b>
2.1.1 PLASTICIDAD DE CORTA DURACIÓN .....	13
2.1.1.1 Ratio por pares de pulsos.....	13
2.1.2 PLASTICIDAD DE LARGA DURACIÓN .....	14
<b>2.2 PLASTICIDAD SINÁPTICA EN EL HIPOCAMPO (SINAPSIS CA3-CA1) .....</b>	<b>17</b>
<b>2.3 SPIKE TIMING-DEPENDENT PLASTICITY .....</b>	<b>20</b>
<b>3. RECEPTORES DE GLUTAMATO DE TIPO NMDA .....</b>	<b>25</b>
<b>3.1 RECEPTORES DE GLUTAMATO.....</b>	<b>25</b>
<b>3.2 PROPIEDADES MOLECULARES Y BIOFÍSICAS DE LOS RECEPTORES DE TIPO NMDA.....</b>	<b>27</b>
3.2.1 FAMILIAS DE SUBUNIDADES: GLUN1, GLUN2 Y GLUN3 .....	28
3.2.2 DIVERSIDAD ESTRUCTURAL DE LOS RECEPTORES DE TIPO NMDA .....	31

<b>3.3 PROPIEDADES BIOFÍSICAS DE LOS RECEPTORES DE TIPO NMDA.....</b>	<b>33</b>
<b>3.4 MODULADORES ENDÓGENOS DE LOS RECEPTORES DE TIPO NMDA.....</b>	<b>35</b>
<b>3.5 RECEPTORES DE TIPO NMDA PRESINÁPTICOS IMPLICADOS EN PLASTICIDAD .....</b>	<b>37</b>

## 1. EL HIPOCAMPO.

Localizado en el interior del lóbulo temporal (Fig. 1), bajo la superficie cortical del cerebro, se encuentra el hipocampo. Es una estructura bilateral, con dos mitades que son imágenes especulares en ambos hemisferios cerebrales, que está formada por un grupo de varios millones de neuronas que se organizan en una red neuronal bastante diferente de aquellas que podemos encontrar en cualquier otro lugar del sistema nervioso. La palabra hipocampo procede del latín, hippocampus, que a su vez procede del griego: ἵππος, hipos-caballo, y κῆπος, kamos-monstruo marino Campe. El nombre le fue dado por el anatomista del siglo XVI Giulio Cesare Aranzio, que advirtió una gran semejanza con la forma del caballito de mar o hipocampo.



**Figura 1. Generalidades del hipocampo.** (A) El hipocampo está localizado en la parte medial del lóbulo temporal del cerebro. (B) Hipocampo humano diseccionado (izquierda) comparado con un espécimen de *Hippocampus leiria* (derecha). Modificado de <http://pubs.niaaa.nih.gov/publications/arh27-2/IMAGES/Page191.gif> y Andersen et al., 2007.

El hipocampo forma parte de un grupo de estructuras cerebrales que se conoce con el nombre de formación hipocampal, a la que pertenecen, además del hipocampo, el giro dentado, el subículo, presubículo y parasubículo (Andersen et al., 2007).

El hipocampo y las estructuras asociadas han atraído la atención de numerosos científicos provenientes de varias de las disciplinas que componen la neurociencia. Tanto es así, que muchos estudios se han centrado en las neuronas con forma piramidal tan características que podemos encontrar en el mismo. Gracias a estos estudios, hoy se conoce mucho acerca del desarrollo, sinaptogénesis, neurotransmisores, receptores y canales iónicos asociados, y la biología celular de estas neuronas. También se conoce una parte de por qué y cuándo se activan estas neuronas en un cerebro vivo. Registros obtenidos de animales vivos en movimiento, por ejemplo mientras exploran un espacio que les resulta familiar, han mostrado que células piramidales individuales del hipocampo disparan en localizaciones concretas de ese espacio (Andersen et al., 2007). Esto planteó nuevas posibilidades para desarrollar herramientas comportamentales para estudiar el mecanismo de la memoria en animales. A lo largo de las extensas arborizaciones dendríticas que se pueden encontrar en las neuronas piramidales que conforman el hipocampo, pueden distinguirse cientos de espinas dendríticas donde parece residir la mayoría de las sinapsis excitadoras. Es más, la eficiencia con la que estas sinapsis excitadoras transmiten los mensajes, puede variar en función de la actividad neuronal. Poco a poco se va conociendo más acerca de la plasticidad sináptica en el hipocampo y los mecanismos bioquímicos subyacentes, y todo apunta a que la plasticidad sináptica es la clave en el mecanismo de la memoria, así como en otros procesos.

Otra característica que atrae la atención de los investigadores hacia la formación hipocampal es el hecho de que las células granulares del giro dentado se multiplican a lo largo de su vida. Esto hace que el giro dentado sea un área potencialmente importante para estudiar neurogénesis, incluso en adultos, así como procesos de reparación neuronal.

Por lo tanto, una característica que hace enfocar hacia el hipocampo numerosos trabajos de investigación es el papel específico que parece tener en los procesos de memoria y plasticidad. Hoy en día está comprobado que existen muchos tipos de memoria y que el hipocampo participa en algunas de ellas, en concreto en las que consisten en recordar información que se puede describir de una forma declarativa (Andersen et al., 2007). Además,

la peculiar anatomía de esta estructura, con las células principales localizadas en capas y las entradas sinápticas definidas en una capa dendrítica, ofrece numerosas ventajas, como por ejemplo, una fácil colocación de electrodos para poder hacer registros tanto de campo como de células individuales. Las rodajas de hipocampo pueden sobrevivir durante horas, y presentan una estratificación estricta de las sinapsis en el árbol dendrítico, lo que no ocurre en otras zonas del cerebro.

Gracias a estudios realizados en el hipocampo fue posible describir por primera vez el principio básico de transmisión excitadora unidireccional y descubrir el fenómeno de potenciación de larga duración (LTP; *long-term potentiation*) (Bliss y Lomo, 1973). El trabajo realizado en hipocampo ha sido la mayor contribución para conocer el funcionamiento de varios tipos de receptores para diversos aminoácidos excitadores e inhibidores, mecanismos de recaptación de neurotransmisores, plasticidad sináptica dependiente de actividad y las consecuencias de la excitotoxicidad en las células del cerebro.

El hipocampo está involucrado en numerosos desórdenes neurológicos como epilepsia, enfermedad de Alzheimer y enfermedades cerebrovasculares. De esta forma, la actividad eléctrica propia de pacientes de epilepsia puede detectarse fácilmente en el hipocampo. O, por ejemplo, los cambios patológicos característicos de la enfermedad de Alzheimer se manifiestan inicialmente en la corteza entorrinal (EC, *entorhinal cortex*), y de aquí los cambios se van extendiendo al hipocampo y finalmente a toda la corteza cerebral.

Retomando el tema de la plasticidad, es importante destacar que las sinapsis que encontramos en el hipocampo son altamente plásticas. Al margen de alteraciones dependientes de actividad de la eficiencia sináptica bien conocidas, como la LTP por ejemplo, existen numerosos casos de cambios anatómicos en las dimensiones de las células y en el número y longitud de axones, ramificaciones y conexiones, así como cambios bioquímicos, que son resultado de diferentes estímulos. El hipocampo ha sido la primera zona del cerebro donde de forma inequívoca se ha demostrado crecimiento axonal (Wang et al., 2011).



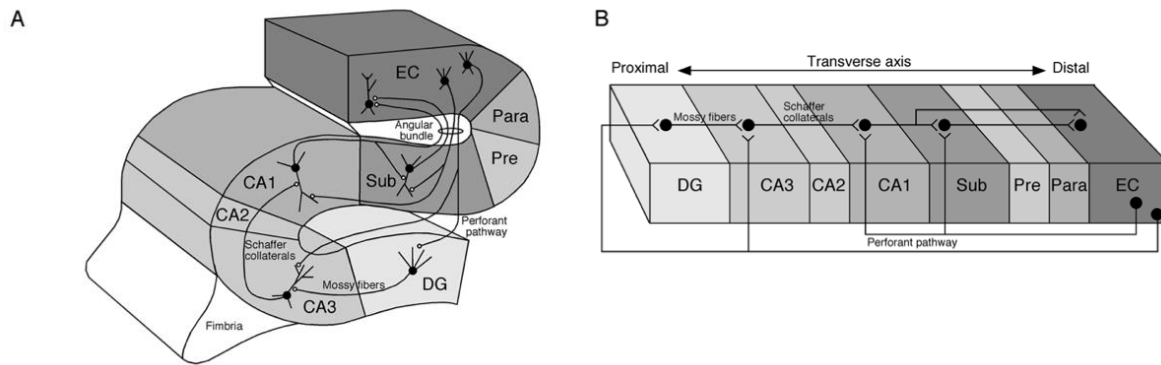
## 1.2 NEUROANATOMÍA DEL HIPOCAMPO.

El hipocampo se encuentra organizado en capas de células con una disposición laminar por la que se distribuye toda la información que procesa, siendo la entrada de información unidireccional (Amaral y Lavenex, 2007).

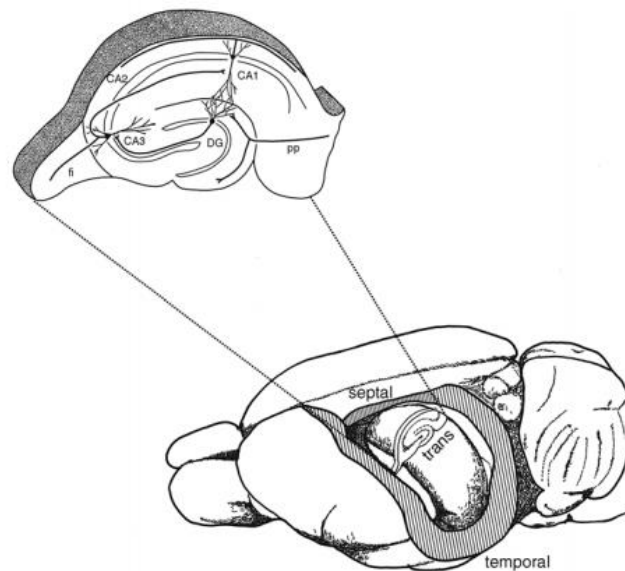
No existe un consenso global acerca de la nomenclatura utilizada para describir las distintas partes que se pueden diferenciar en el hipocampo, a pesar de las múltiples investigaciones que se han ocupado de él. Pero se suelen admitir tres subdivisiones: CA3, CA2 y CA1 (CA deriva de *Cornu Ammonis*) que se repiten en ratas, monos y humanos de forma similar, aunque con diferencias en cuanto, por ejemplo, al espesor de las capas celulares o al tamaño y número de las subdivisiones.

La entrada de información neocortical alcanza la formación hipocampal a través de la corteza entorrinal. Las células de las capas superficiales de la corteza entorrinal proyectan sus axones al giro dentado (DG, *dentate gyrus*), entre otros destinos, formando parte de la principal entrada de información al hipocampo. Estos axones que contactan con el giro dentado forman lo que se denomina vía perforante.

Las principales células del giro dentado, las células granulares, proyectan sus axones, las fibras musgosas, hacia la región de CA3, conectando con las células piramidales de CA3, que son, a su vez, la fuente de entrada a la región CA1 (los axones de CA3 que proyectan a CA1 se denominan colaterales de Schaffer). Las células de la región CA1 proyectan al subiculum, proporcionando la mayor salida de información excitadora del hipocampo. A partir de aquí el patrón de conexiones intrínsecas empieza a ser un poco más elaborado, de tal forma que las células de CA1 proyectan no sólo al subiculum sino también a la corteza entorrinal. El subiculum también proyecta al presubiculum y el parasubiculum (Amaral y Lavenex, 2007) (Fig. 2). En resumen, el circuito trisináptico excitador del hipocampo está constituido, en este orden, por las sinapsis EC-DG (sinapsis 1), DG-CA3 (sinapsis 2) y CA3-CA1 (sinapsis 3) (Fig. 3).



**Figura 2. Conexiones en la formación hipocámpica.** (A) Las neuronas de la capa II de la corteza entorrinal proyectan al giro dentado y CA3 a través de la vía perforante. Las neuronas de la capa III de la corteza entorrinal proyectan a CA1 y al subiculum, a través de la vía perforante y la vía alvear. Las células granulares del giro dentado proyectan a CA3 vía fibras musgosas. Las neuronas piramidales de CA3 proyectan a CA1 vía colaterales de Schaffer. Las células piramidales de CA1 proyectan al subiculum. CA1 y el subiculum proyectan hacia las capas profundas de la corteza entorrinal. (B) Proyecciones a lo largo del eje transversal de la formación hipocámpica. El giro dentado se localiza de forma proximal y la corteza entorrinal de forma distal. Tomado de Amaral y Lavenex, 2007.

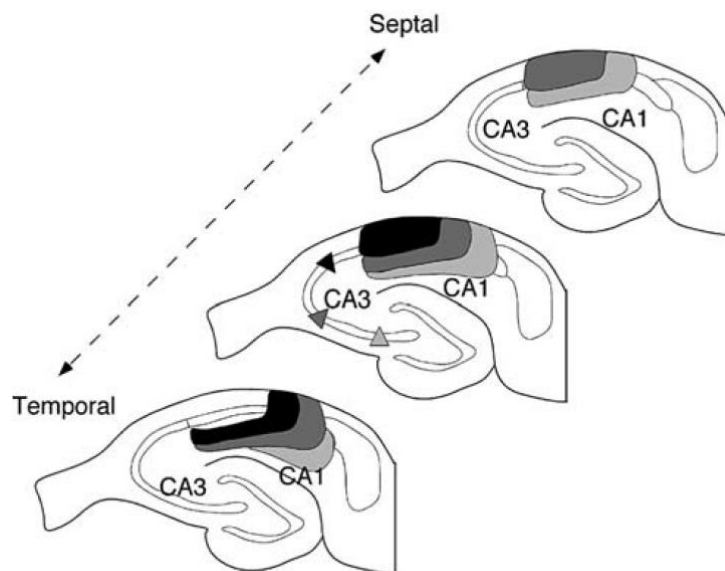


**Figura 3. Circuito trisináptico del hipocampo.** Esquema que muestra las principales sinapsis que se pueden encontrar en el hipocampo de rata. Tomado de Amaral y Lavenex, 2007.

## 1.2 LA SINAPSIS ESTABLECIDA ENTRE LAS COLATERALES DE SCHAFER DE LAS CÉLULAS DE CA3 (CA3) Y LAS CÉLULAS PIRAMIDALES DE LA REGIÓN DE CA1.

En el presente trabajo se presentan estudios realizados en la sinapsis establecida entre las colaterales de Schaffer y las células piramidales de la región CA1 del hipocampo de ratón. Las colaterales de Schaffer son los axones de las células piramidales de la región CA3 del hipocampo, que proyectan hasta la región de CA1.

Las proyecciones de CA3 hacia CA1 son la principal entrada de información en las células piramidales de CA1 (Ishizuka et al., 1990). Dichas proyecciones terminan sobre las dendritas basales en el *stratum oriens* y sobre las dendritas apicales en el *stratum radiatum*. Los axones individuales de las células piramidales de CA3 muestran una extensa distribución, innervando neuronas de CA1 en gran parte de la extensión septotemporal del hipocampo (dos tercios de la extensión total) (Fig. 4) (Li et al., 1994).



**Figura 4. Organización de las proyecciones desde la región de CA3 (Colaterales de Schaffer) hasta la región de CA1 del hipocampo.** La localización de las células de origen se indica mediante pequeños triángulos. Los terminales de estas células están indicados mediante sombras en una escala de grises similar a las células de origen. Tomado de Amaral y Lavenex, 2007.

Las células de la región proximal CA3 (más cercana al giro dentado) en el hipocampo, son las únicas que muestran las colaterales de Schaffer descritas clásicamente. El espesor característico de estos axones puede reflejar las largas distancias que deben recorrer para inervar a una célula distal de CA1. Los axones de las células localizadas en la región distal de CA3 en el hipocampo tienden a ser mucho más finos y proyectan directamente hacia CA1.

Sorprendentemente, la conectividad entre las células de las regiones CA3 y CA1 de hipocampo aun no está clara, pero se estima que es bastante baja. El trabajo de Harris y colaboradores (Sorra y Harris, 1993), el cual fue replicado por Trommaid et al.,(1996), indica que quizás hay tan solo de dos a cuatro contactos entre un único axón y un árbol dendrítico particular y, ciertamente, no más de 10 sinapsis entre neuronas típicas de CA3 y CA1.

Esta baja conectividad dificulta tremendamente llevar a cabo estudios en los cuales se registren pares de neuronas de la región CA3 y CA1 conectados para poder determinar los componentes presinápticos involucrados en el mecanismo objeto de estudio.

## 2. PLASTICIDAD SINÁPTICA.

Comprender los procesos de memoria y aprendizaje es uno de los objetivos principales en Neurociencia. La asociación de situaciones, personas y objetos percibidos por nuestros sentidos en el día a día, contribuirán y darán forma a la manera en la que percibiremos el mundo exterior en el futuro.

Aristóteles introdujo por primera vez, en su tratado *De Anima*, la noción de la mente como una *tabula rasa*, o pizarra en blanco, idea que en el Siglo XI fue desarrollada por el filósofo islámico Avicena, el cual argumentó que la mente era una pizarra en blanco al nacer y que más tarde se desarrollaba a través de la educación. Este punto de vista sobre el aprendizaje en el cerebro, ha tenido un poderoso efecto sobre posteriores filósofos y psicólogos y llegó a aceptarse generalmente en psicología a mediados del Siglo XIX. Es en esa época cuando filósofos, psicólogos y los primeros fisiólogos empezaron a intentar descubrir los mecanismos que forman las bases fisiológicas del aprendizaje y la memoria (Markram et al.2011).

En la segunda mitad del Siglo XIX se asentaron las bases experimentales del condicionamiento clásico, también llamado condicionamiento pavloviano. Este proceso consiste en la modificación del comportamiento, donde una respuesta innata a un potente estímulo biológico “A” termina expresándose en respuesta a un estímulo neutral “B”. Ello se consigue por el pareamiento repetido del estímulo biológico significativo y el estímulo neutral. Los experimentos realizados por Pavlov durante 12 años sobre la salivación y digestión condicionada en su perro, se publicaron en 1897. Es sorprendente que los sustratos neurales de este tipo de aprendizaje sean aún objeto de una intensa investigación teórica y experimental (Pavlov, 1897; Markram et al., 2011).

La identificación de neuronas como componentes individuales del tejido nervioso por el neurocientífico español Santiago Ramón y Cajal sentó las bases para la expansión de la neurociencia. La primera mitad del Siglo XX fue testigo de estudios que hoy en día son un referente y que definieron los elementos claves del sistema nervioso: la sinapsis química, neurotransmisores y las propiedades eléctricas de las membranas excitables, entre otros.

Al principio de la segunda mitad del Siglo XX, el neuropsicólogo canadiense Donald Hebb, reunió en su libro “La organización del comportamiento” muchas de las primeras ideas sobre el aprendizaje y la memoria en un postulado formal, tremendamente influyente, sobre los mecanismos neurales que subyacen a estos procesos (Hebb, 1949).

*“Cuando un axón de una célula A está lo suficientemente cercano de una célula B como para excitarla y participa repetida o persistentemente en su disparo, ocurre algún proceso de crecimiento o cambio metabólico en una o en ambas células de modo tal que aumenten tanto la eficiencia de A como la capacidad de excitación de la célula B”.*

Hebb postuló que la coactivación repetida y persistente de las neuronas debería incrementar la fuerza conectiva entre poblaciones de neuronas interconectadas como medio del almacenamiento de los recuerdos. Las ideas de Hebb inspiraron a muchos neurocientíficos que intentaron demostrar experimentalmente cómo la plasticidad sináptica podría ser responsable del condicionamiento clásico pavloviano.

El trabajo de Kandel relacionó consistentemente la plasticidad sináptica con el aprendizaje asociativo del reflejo de defensa en *Aplysia* (Kandel y Tauc, 1964). Aunque la presunta relación entre la plasticidad sináptica y el almacenamiento de la información en el cerebro de mamíferos no está bien establecida aún (Stevens, 1998; Sjöström et al., 2008), la importancia de la investigación de Kandel (2001) sobre el aprendizaje en *Aplysia* es innegable. En la actualidad, los mecanismos moleculares, biofísicos y celulares que subyacen el aprendizaje comportamental en *Aplysia* se conocen en gran detalle (Bailey y Kandel, 2008). Curiosamente, esta forma de plasticidad no es hebbiana.

## 2.1 DIFERENTES TIPOS DE PLASTICIDAD SINÁPTICA

Una revisión completa sobre plasticidad sináptica queda fuera del alcance de esta introducción. En esta sección se resumirán algunos conceptos y datos que darán una idea general del campo.

### 2.1.1 PLASTICIDAD DE CORTA DURACIÓN.

La plasticidad de corta duración (STP, *short term plasticity*) proporciona a las sinapsis un poder computacional adicional y tiene importantes implicaciones en la diversidad de señalización en los circuitos neuronales. El rango de acción de la STP abarca desde la potenciación a la depresión y su escala temporal va desde milisegundos hasta minutos. Las diferentes sinapsis de una misma neurona pueden expresar una amplia variedad de formas de plasticidad (Blackman et al., 2013; Trommershäuser et al., 2003).

La STP surge mayoritariamente de cambios en la liberación del neurotransmisor en diferentes escalas temporales, pero también han sido descritos mecanismos postsinápticos, como de-sensibilización del receptor o señalización metabotrópica. Como la liberación del neurotransmisor depende del patrón de la actividad presináptica, las sinapsis pueden considerarse filtros con propiedades distintivas (Dittman et al., 2000; Fortune and Rose, 2001; Fuhrmann et al., 2002).

#### 2.1.1.1 Ratio por pares de pulsos.

Se pueden monitorizar varios parámetros para identificar las modificaciones presinápticas de liberación (Branco and Staras, 2009). Los más usados son el análisis de los cambios en el ratio por pares de pulsos (PPR, *paired-pulse ratio*) y el análisis del coeficiente de variación (CV). El PPR se define como el ratio entre las amplitudes (o pendientes) de la segunda y la primera respuesta postsináptica tras la aplicación de un par de estímulos.

La facilitación por pares de pulsos (PPF, *Paired-pulse facilitation*) se atribuye normalmente a los efectos del incremento del calcio residual en el terminal presináptico, o la unión del calcio a dianas moleculares presinápticas que parecen ser distintas de las que son responsable de la exocitosis rápida, pero que pueden afectar a la probabilidad de liberación (Pr) (Zucker and Regehr, 2002).

La depresión por pares de pulsos (PPD, del inglés *paired-pulse depression*) se atribuye normalmente al vaciado del conjunto de vesículas preparadas para la liberación (Zucker and Regehr, 2002). Además, la depresión puede también surgir de la activación de receptores pre o postsinápticos y de procesos postsinápticos tales como la de-sensibilización del receptor.

Una advertencia importante acerca de la interpretación del PPR es que su relación con la Pr no se conoce en muchos casos (Dobrunz and Stevens, 1997), y la Pr en sí es un parámetro que raramente se conoce. De todos modos, se considera al PPR una aproximación útil para sugerir si un fenómeno de plasticidad sináptica es pre o postsináptico.

Un único axón puede hacer contacto con diferentes dianas y mostrar diferentes propiedades de liberación (y PPR) para cada sinapsis, sugiriendo que la identidad de la célula postsináptica es un determinante importante de la Pr (Blackman et al. 2013). Esta influencia postsináptica puede ejercerse durante la sinaptogénesis o por medio de regulación dinámica retrógrada después de la formación de las sinapsis.

### 2.1.2 PLASTICIDAD DE LARGA DURACIÓN.

Se piensa que las modificaciones de la eficacia sináptica de larga duración son el substrato neuronal de los procesos de memoria y aprendizaje (Nabavi et al., 2014; Whitlock et al., 2006). Los fenómenos de potenciación y depresión de larga duración (LTD, *long-term depression*) permiten a las células adaptarse a las limitaciones internas (Espinosa y Stryker, 2012) o externas (Turrigiano, 2008).

La plasticidad de larga duración puede expresarse pre y postsinápticamente. Se han estudiado tres hipótesis principales sobre la naturaleza de los cambios asociados con la plasticidad, las cuales no son excluyentes entre sí:

- Cambios en la probabilidad de liberación (Malinow y Tsien, 1990)
- Inserción o internalización de receptores de tipo AMPA en la membrana de la neurona postsináptica (Huganir y Nicoll, 2013).
- Fosforilación y de-fosforilación de los receptores de tipo AMPA que dan lugar a cambios en la conductancia (Lee et al., 2000).



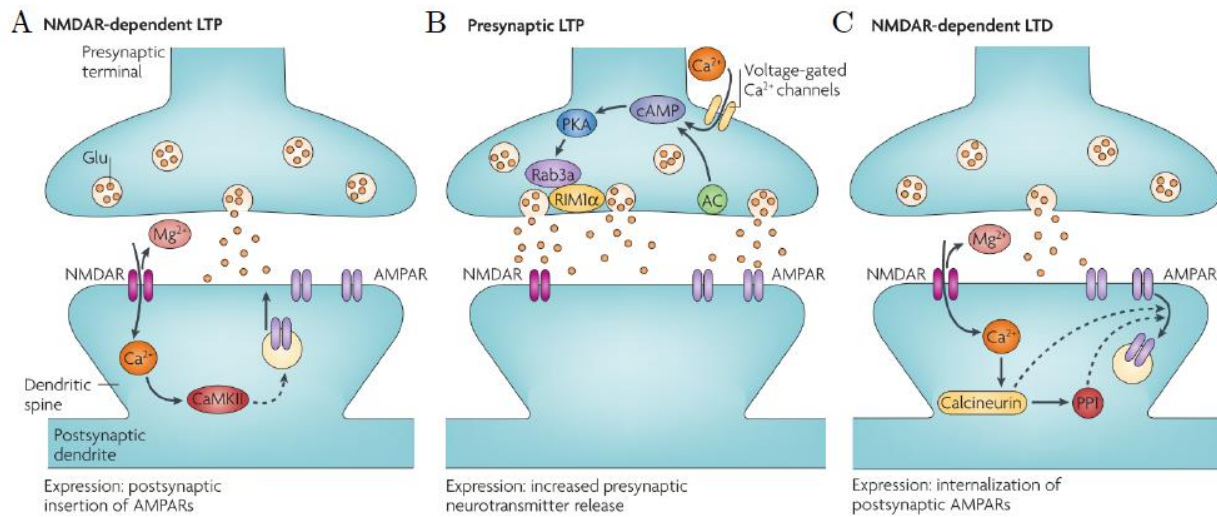
Más allá de la importancia relativa de los dos loci de expresión (Lisman, 2009), la plasticidad de larga duración se ha utilizado satisfactoriamente como base teórica para explicar la formación de recuerdos. Recientemente, en un estudio llevado a cabo por Nabavi y colaboradores (2014), se ha mostrado *in vivo* que un comportamiento aprendido puede inactivarse o reactivarse mediante protocolos de inducción de LTD y LTP, respectivamente.

Se ha descrito un amplio rango de mecanismos de inducción que dependen del tipo de sinapsis, del paradigma experimental, e incluso, en la misma especie, de la edad o la temperatura. Algunos de los mecanismos de inducción más frecuentes dependen de la activación de receptores de tipo NMDA que actúan como detectores de coincidencia (Fig. 5).

Como ejemplo de esta heterogeneidad, la inducción de plasticidad puede involucrar, además de a las neuronas pre y postsinápticas, a otros participantes celulares (plasticidad heterosináptica). Uno de los primeros ejemplos de plasticidad heterosináptica y de los mecanismos moleculares que subyacen a este tipo de plasticidad se describió en el laboratorio de Eric Kandel en el sistema sensorial de *Aplysia* (Antonov et al., 2003). Desde entonces, la plasticidad heterosináptica se ha observado en muchos modelos sinápticos, en los cuales se requiere de una liberación adicional de neuromoduladores, transmisión inhibitoria o astrocitos. (Chevalleyre y Castillo, 2003; Dittman y Regehr, 1997; Hartell, 2000; Ishikawa et al., 2013; Panatier et al., 2006; Rose et al., 2009). De todos modos, el significado fisiológico de este tipo de plasticidad sináptica sigue debatiendo actualmente.

Además de la plasticidad de corta y larga duración, existen mecanismos que permiten a las sinapsis y a los circuitos neuronales mantener niveles apropiados de excitabilidad y conectividad. Dichos mecanismos se conocen como plasticidad homeostática (Turrigiano et al., 1998).

La siguiente sección se centrará en describir varias formas de plasticidad sináptica de larga duración caracterizadas en el hipocampo, concretamente en la sinapsis CA3-CA1, la cual es objeto del presente trabajo.



**Figura 5. Formas de LTP y LTD ampliamente estudiadas.** Diagramas simplificados de la inducción y la expresión de distintas formas de plasticidad sináptica observadas en algunas estructuras en el cerebro de roedores. **(A)** La LTP dependiente de receptores de tipo NMDA se ha observado en muchas regiones diferentes del cerebro. Su inducción depende de la activación de los receptores de tipo NMDA postsinápticos y de la proteína Quinasa II dependiente del complejo Calcio/Calmodulina (CaMKII). El cese del bloqueo por Mg<sup>2+</sup> dependiente de voltaje de los receptores de tipo NMDA permite a la sinapsis detectar la coincidencia de la liberación presináptica de glutamato y la despolarización postsináptica. La inserción de receptores de tipo AMPA en la membrana postsináptica es el mecanismo principal que subyace a la expresión de LTP. **(B)** Se ha caracterizado una forma de LTP presináptica en la sinapsis establecida entre las fibras musgosas y la región CA3 del hipocampo, así como en la sinapsis cerebelar entre las fibras paralelas y las células de Purkinje. La actividad sináptica repetitiva da lugar a la entrada de Ca<sup>2+</sup> presináptico, el cual activa a la Adenilato ciclasa (AC). La activación de la AC produce un aumento de los niveles de AMPc, activando éste a la proteína Quinasa A (PKA). Esto a su vez modifica las funciones de Rab3a y RIM1α permitiendo el incremento de la liberación de glutamato. **(C)** La LTD dependiente de receptores de tipo NMDA se activa por la entrada de calcio a través de los receptores de tipo NMDA postsinápticos, permitiendo un incremento en la actividad de la proteína fosfatasa Calcineurina y la proteína Fosfatasa 1 (PP1). El mecanismo principal de expresión involucra la internalización de los receptores de tipo AMPA postsinápticos. Tomado de Kauer y Malenka, 2007.

### 2.3. PLASTICIDAD SINAPTICA EN EL HIPOCAMPO.

La conexión entre memoria e hipocampo tiene sus raíces en la observación clínica de varios pacientes que sufrieron daño cerebral.

Bliss y Lomo, en 1973, indujeron experimentalmente por primera vez la LTP en la sinapsis establecida entre la vía perforante y las células granulares del giro dentado. Tras dicho descubrimiento, cientos de estudios sobre plasticidad sináptica se han llevado a cabo en el hipocampo.

La sinapsis establecida entre las colaterales de Schaffer (CA3) y las células piramidales de CA1 se ha considerado como la sinapsis modelo en estudios de plasticidad. Douglas y Goddard, en 1975, mostraron que repetidas ráfagas de estimulación a alta frecuencia eran más efectivas para inducir LTP que un simple tren de estimulación tetánica de mayor duración. Esto indica la importancia de periodos repetidos de estimulación para inducir LTP, como predijo Donald Hebb. En 1977, Gary Lynch y colaboradores descubrieron la LTD en el hipocampo. Ellos encontraron que, mientras que la estimulación tetánica inducía LTP en la ruta activada, en la ruta inactiva se inducía LTD (Lynch et al., 1977). Además encontraron que la LTD homosináptica se inducía cuando se estimulaba la ruta activada con frecuencias más bajas (Dunwiddie y Lynch, 1978).

Tras estos estudios iniciales, el uso de inhibidores farmacológicos y herramientas genéticas han permitido especificar algunas moléculas determinantes implicadas en estos procesos de plasticidad.

En la LTP expresada postsinápticamente, está ampliamente aceptado que el flujo de calcio a través de los receptores de tipo NMDA conduce a la activación del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ /Quinasa calmodulina (CaMKII) en esta sinapsis (Fig. 5.A) (Lisman et al., 2002; Nabavi et al., 2014) aunque en tejidos de animales muy jóvenes, está implicada la activación de la proteína Quinasa A (PKA, *protein Kinase A*) (Yasuda et al., 2003). La activación de estas quinasas desemboca finalmente en un incremento del número de receptores de tipo AMPA y/o su conductancia en el terminal postsináptico, así como en la remodelación de las espinas

dendríticas. Se ha descrito que otras proteínas quinasas están involucradas en la LTP, por ejemplo la proteína Quinasa C (PKC, *protein Kinase C*) (Bliss and Collingridge, 1993; Hu et al., 1987; Rance et al., 1989).

Se piensa que las pequeñas GTPasas Ras y Rap pueden ser un puente entre la activación de los receptores de tipo NMDA y el reemplazo de los receptores de tipo AMPA. Ras y Rap ejercen sus efectos sobre los receptores de tipo AMPA que contienen diferente composición en subunidades. Por tanto, estas GTPasas, cuya actividad puede controlarse por enzimas postsinápticas actúan como reguladores independientes de la plasticidad en la sinapsis CA3-CA1 (Zhu et al., 2002). Se han descrito otras pequeñas proteínas G, tales como Rac1, Cdc42 y RhoA que juegan un papel esencial como moduladores de la eficacia sináptica durante la LTP dependiente de receptores de tipo NMDA (Qin et al., 2005; Wiens et al., 2005; Xie et al., 2007).

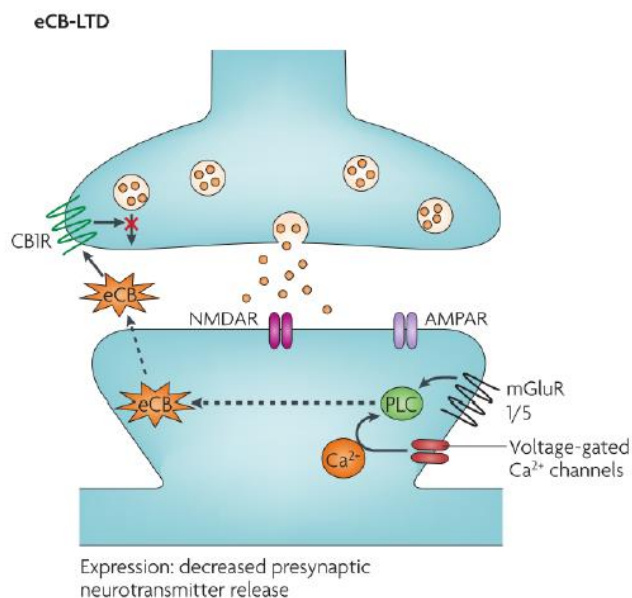
En esta sinapsis se conocen varias formas de LTD expresadas postsinápticamente (Fig. 5.C). Encontrar un protocolo de inducción capaz de inducir LTD homosináptica expresada postsinápticamente en la sinapsis CA3-CA1 llevó mucho tiempo (Dudek y Bear, 1992). Uno de los protocolos más extendidos descrito para inducir LTD dependiente de receptores de tipo NMDA consistió en estimular a baja frecuencia durante varios minutos (e.g. 1 Hz, 900 veces). Si se despolariza levemente la célula piramidal para disminuir el bloqueo por  $Mg^{2+}$  o si se aplican neuromoduladores específicos, el número necesario de repeticiones puede variar (Selig et al., 1995; Kirkwood et al., 1999; Scheiderer et al., 2004). Se ha demostrado que la inhibición de los receptores de tipo NMDA previene la inducción de esta forma de LTD (Dudek y Bear, 1992; Mulkey y Malenka, 1992), y la activación de estos receptores, en ciertas condiciones, la induce (Cummings et al., 1996; Kamal et al., 1999; Kandler et al., 1998; Lee et al., 1998; Li et al., 2004). La cascada de señalización que desencadena la activación de los receptores de tipo NMDA requiere de señalización por  $Ca^{2+}$ , dado que la realización de experimentos de inducción de LTD en presencia de BAPTA, un quelante de  $Ca^{2+}$ , previno esta forma de plasticidad (Mulkey y Malenka, 1992).

Se ha propuesto un modelo simplificado para la plasticidad sináptica, donde el  $Ca^{2+}$  entra a las espinas dendríticas postsinápticas a través de los receptores de tipo NMDA, activando cascadas de señalización que permiten su inducción. Los niveles de  $Ca^{2+}$  así como

de la localización específica de la señalización mediada por el mismo, en la célula postináptica, pueden ser elementos claves para determinar la dirección de la plasticidad, dando lugar a LTP o LTD.

La diversidad en la composición en subunidades de los receptores de tipo NMDA es un elemento adicional que confiere una mayor diversidad en las reglas que gobiernan la inducción de la plasticidad sináptica. La diferente composición en subunidades de los receptores de tipo NMDA le confieren al receptor distintas propiedades cinéticas y farmacológicas (Monyer et al., 1992) pudiendo reclutar diferentes moléculas implicadas en cascadas de señalización intracelular (Leonard et al., 1999). En la sección 3.1 de esta introducción se describirán detalladamente las propiedades moleculares, biofísicas y funcionales de estos receptores.

Se ha descrito también una forma de LTD expresada presinápticamente en la sinapsis CA3-CA1. La inducción de esta forma de plasticidad es dependiente de tipo NMDA presinápticos, donde el óxido nítrico (NO) actúa como mensajero retrógrado (Stanton et al., 2003; Zhang et al., 2006). Otra forma de plasticidad encontrada en el cerebro, y en particular en CA1, es la LTD mediada por endocannabinoides (eCBs), la cual requiere de la activación de la ruta de señalización cAMP/PKA (Chevalleyre et al., 2007; Heifets y Castillo, 2009). Esta forma de plasticidad es independiente de los receptores de tipo NMDA (Fig. 6)



**Figura 6. Forma de LTD dependiente de señalización mediada por eCBs.** Diagrama simplificado de la inducción y expresión de una forma de LTD observada en algunas estructuras en el cerebro de roedores. La activación de los receptores metabotrópicos de tipo 1 y 5 permite la activación de la Fosfolipasa C (PLC, *Phospholipase C*) y/o un incremento de los niveles de calcio intracelular, lo que da lugar a la síntesis de eCBs. Los eCBs son liberados desde la neurona postsináptica y viajan retrógradamente para unirse a los receptores presinápticos cannabinoides de tipo 1 (CB1). La prolongada activación de los receptores CB1 deprime la liberación del neurotransmisor mediante mecanismos que aún se desconocen. Modificado de Kauer y Malenka, 2007.

### 2.3 SPIKE TIMING-DEPENDENT PLASTICITY.

Una de las propiedades más interesantes del cerebro de mamíferos es su habilidad para cambiar en respuesta a la experiencia.

La Spike timing-dependent plasticity (STDP) es una regla Hebbiana de aprendizaje involucrada en el refinamiento de las sinapsis durante el desarrollo y en procesos de aprendizaje y memoria en adultos (Dan y Poo, 2004; Feldman y Brecht, 2005; Caporale y Dan, 2008). Este mecanismo ha sido estudiado en multitud de organismos, desde insectos hasta humanos, así como en multitud de regiones cerebrales y diferentes tipos neuronales (Abbott y Nelson, 2000; Sjöström et al., 2008; Caporale y Dan, 2008; Feldman, 2012; Markram et al., 2012).

En 1961, Eccles propuso que el potencial de acción puede propagarse en ambas direcciones. Posteriormente, Levy y Sterward (1983) realizaron un estudio en el cual demostraron que la dirección y la magnitud de los cambios sinápticos dependían del orden temporal de estimulación de dos entradas diferentes (una fuerte y otra débil) desde la corteza entorrinal al giro dentado.

Diez años más tarde, Gerstner y colaboradores (1993) propusieron que la relación temporal entre espigas individuales pre y postsinápticas contenía más información para la plasticidad que la frecuencia media de disparo, por lo que el preciso instante en el que se genera un potencial de acción (AP, *action potential*) postsináptico debe ser comunicado a la sinapsis.

De hecho, el papel de la propagación 'hacia atrás' del PA (bAP, *action potential backpropagation*) en la inducción de plasticidad se describió por primera vez a principio de los años 80 (Baranyi y Feher, 1981a, b). Este descubrimiento se retomó una década más tarde y se redescubrió con la llegada de las técnicas de patch clamp en los años 90. En particular, registros duales desde el soma y la dendrita de la misma neurona permitieron demostrar que el PA se propagaba hacia las dendritas (Stuart y Sakmann, 1994, Markram et al. 1995).

Henry Markram, en el laboratorio de Bert Sakmann, se cuestionó cómo podía influir en la plasticidad sináptica la señal de calcio desencadenada por la bPA y fue el primero en demostrar su implicación en dichos procesos. Registrando pares de neuronas conectadas en la capa 5 de la corteza visual en rodajas de cerebro de rata, encontró que el apareamiento de un PA postsináptico con un EPSP, con un intervalo temporal de 10 ms positivo o negativo, daba lugar a potenciación o depresión sináptica, respectivamente (Markram et al., 1997). Gracias a este estudio se confirmó por primera vez el papel la bPA en plasticidad.

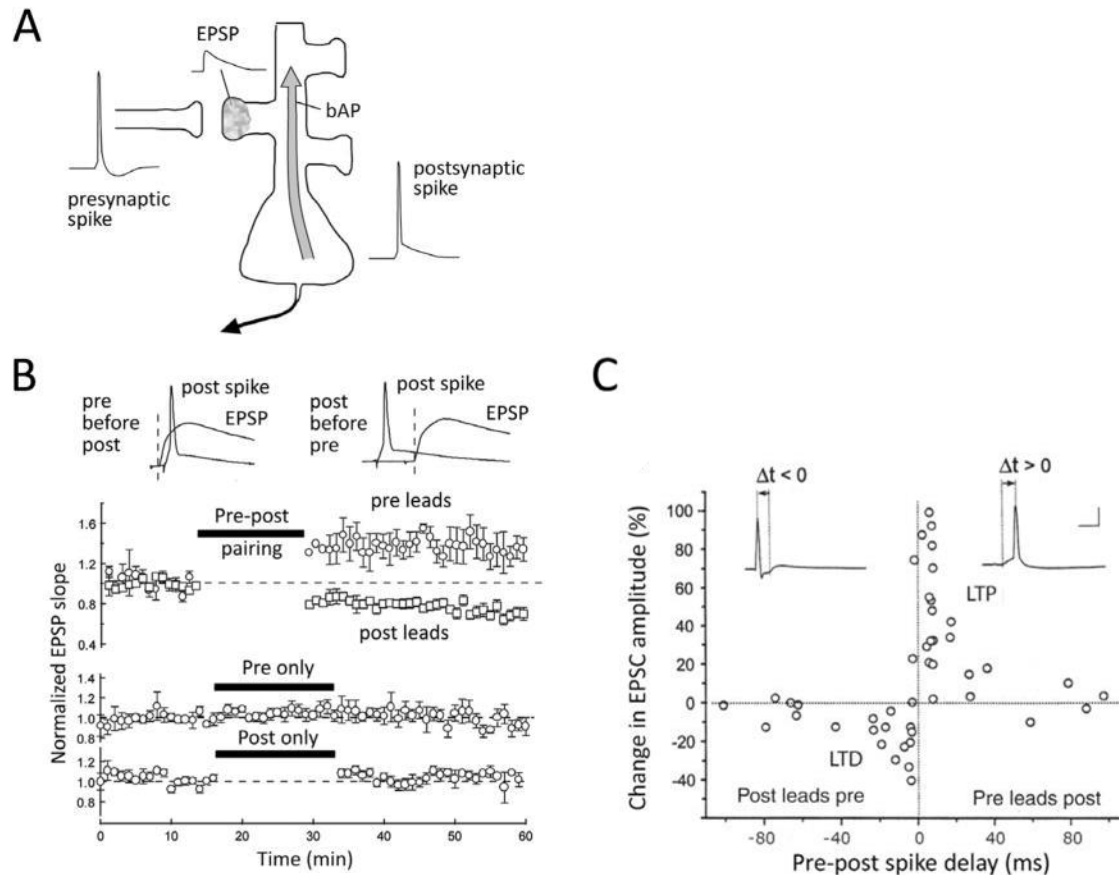
Mientras que la mayoría de los estudios sugerían una correlación de  $\pm 100$  ms como requerimiento para la inducción de plasticidad (Baranyi y Feher, 1981b, Gustafsson et al., 1987), algunos estudios notaron el efecto del orden temporal de la actividad pre o postsináptica sobre la misma. La LTP ocurría cuando la actividad presináptica precedía (o era sincrónica) a la actividad postsináptica, mientras que la LTD ocurría cuando la actividad postsináptica precedía a la actividad presináptica (Debanne et al., 1994; Debanne et al., 1996; Levy y Steward, 1983).

Gerstner y colaboradores en 1996 ya habían predicho de forma teórica, sin conocer los resultados de Markram (Markram et al., 1997), una forma de plasticidad neuronal dependiente del orden y la coincidencia temporal entre la actividad pre y postsináptica para explicar la exquisita precisión temporal en la localización del sonido en el sistema auditivo de la lechuza común.

Al mismo tiempo, Magee y Johnston (1997) realizaron registros dendríticos para demostrar que la LTP se induce más fácilmente cuando se permite la bAP que cuando no se permite, actuando como una señal asociativa. El bAP puede ser el representante de la integración de todas las entradas sinápticas y es además una señal asociativa ideal entre todas las entradas sinápticas individuales procedentes desde las dendritas (Abbott y Blum, 1996; Blum y Abbott, 1996).

Bi y Poo (1998) caracterizaron detalladamente la dependencia de la ventana temporal para inducir plasticidad en cultivos de células hipocámpales. La repentina transición entre LTP y LTD entre -10 ms y 10 ms se consideró un hecho sorprendente, sin embargo hoy día está considerada como una de las marcas distintivas de la plasticidad dependiente de la coincidencia temporal entre la actividad pre y postsináptica. Song y colaboradores bautizaron a

esta forma de plasticidad con el nombre de 'Spike timing-dependent plasticity' en el año 2000 (Fig. 7).



**Figura 7. Spike timing-dependent plasticity.** (A) Inducción de la STDP mediante el pareamiento de EPSPs con potenciales de acción postsinápticos. (B) La activación de la actividad presináptica seguida por la activación de la actividad postsináptica produce LTP mientras que la activación postsináptica seguida por la activación presináptica produce LTD. (Tomado de Feldman 2000). (C) STDP en cultivos celulares de células hipocámpales. (Tomado de Bi y Poo, 1998).

Debanne y colaboradores (1998) también encontraron que los protocolos de pareamiento inducían STDP en cultivos organotípicos de rodajas de hipocampo, pero



observaron una asimetría relevante entre las ventana temporales capaces inducir LTD y LTP, siendo mucho más amplia para la inducción de LTD.

Sjöström y colaboradores (2001) encontraron también este tipo de desequilibrio para la LTP y la LTD dependientes de la coincidencia temporal entre la actividad pre y postsináptica (t-LTP y t-LTD), en la sinapsis neocortical establecida entre las neuronas de la capa 5. En modelos teóricos, se ha mostrado que este tipo de desequilibrio podría ayudar a preservar la estabilidad en plasticidad sináptica (Song et al., 2000; Kempter et al., 2001).

En resumen, la frecuencia de disparo (Sjöström et al., 2001; Sjöström et al., 2003), el intervalo temporal específico entre la actividad pre y postsináptica (Bi y Poo, 1998), el potencial de membrana postsináptica (Debanne et al., 1994; Debanne et al., 1995) y los neuromoduladores (Zhang et al., 2009) controlan eficacia sináptica durante la STDP.

También se han descrito formas de STDP gobernadas por reglas de plasticidad Hebbiana en sinapsis inhibitorias (Haas et al., 2006), así como formas de STDP que no siguen las reglas de plasticidad propuesta por Hebb (anti-hebbiana) en muchas regiones del cerebro (Bell et al., 1997; Han et al., 2000; Zhao y Tzounopoulos, 2011).



Figura 8. Cronografía de la Spike timing-dependent plasticity. Tomado de Markram et al., 2011.

### 3. RECEPTORES DE GLUTAMATO DE TIPO NMDA.

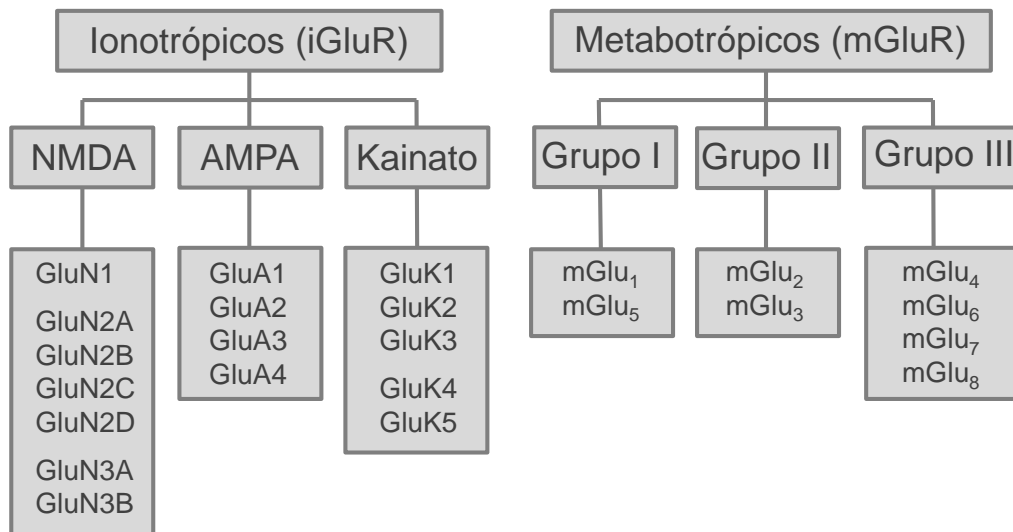
Comprender las propiedades biofísicas de los receptores activados en la sinapsis establecida entre las colaterales de Schaffer (CA3) y las células piramidales de CA1 durante procesos de plasticidad, es necesario para comprender las reglas que los gobiernan. Cada protagonista molecular tiene propiedades específicas que traducen los patrones de actividad en rutas de señalización celular, lo que da lugar a diferentes formas de plasticidad. Esta sección se centrará en describir los receptores de glutamato tipo NMDA, ya juegan un papel fundamental en la inducción de la STDP.

#### 3.1 RECEPTORES DE GLUTAMATO.

Glutamato es el neurotransmisor excitador más importante del Sistema Nervioso Central (SNC) de los mamíferos. Este neurotransmisor participa en la transmisión sináptica normal, así como en procesos de plasticidad sináptica, que se consideran los correlatos celulares de los procesos de aprendizaje y memoria (Anwyl, 1999; Kandel et al., 2000; Citri y Malenka, 2008; Kreitzer y Malenka, 2008; Neves et al., 2008; Butz et al., 2009).

La transmisión glutamatérgica también está implicada en procesos de sinaptogénesis y maduración neuronal. Un mal funcionamiento del sistema glutamatérgico puede ser la causa de algunos tipos de epilepsia y contribuir al desarrollo de alteraciones del SNC como isquemia cerebral, hipoglicemia, Alzheimer, Parkinson, Corea de Huntington o Esclerosis Lateral Amiotrófica (Pin y Duvoisin, 1995; Dingledine et al., 1999; Meador-Woodruff y Healy, 2000; Lerma et al., 2001).

Las acciones fisiológicas del glutamato están mediadas por la activación de sus receptores y sistemas de señalización. Los receptores que el glutamato activa se dividen en dos grandes familias: ionotrópicos y metabotrópicos (Fig. 9).



**Figura 9. Clasificación de los receptores de glutamato.**

Los receptores ionotrópicos de glutamato (iGluRs) participan en la neurotransmisión rápida en el sistema nervioso y se clasifican en tres tipos, en función del agonista que los activa con mayor afinidad: receptores de tipo NMDA (ácido N-metil-D-aspartico), de tipo AMPA (ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico) y receptores de tipo kainato (Traynelis et al., 2010). Estos receptores forman un canal catiónico con diferente selectividad iónica según el tipo de receptor, siendo permeables a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y, en ocasiones, a  $\text{Ca}^{2+}$ . Son proteínas integrales de membrana que están formados por 4 subunidades (tetrámeros) iguales (homómeros) o distintas (heterómeros).

Los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs) participan en la neurotransmisión lenta en el SNC. Se dividen en ocho tipos (mGlu 1-8) y están acoplados a proteínas G. Se clasifican en tres grupos de receptores:

- Grupo I: Constituido por receptores mGlu1 y mGlu5. Están acoplados de forma positiva a la fosfolipasa C (PLC), la cual promueve la conversión del inositol difosfato

- (PIP<sub>2</sub>) a diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>). DAG activa una PKC que puede fosforilar receptores ionotrópicos de glutamato. IP<sub>3</sub> tiene numerosos efectos intracelulares, incluyendo la estimulación de la liberación de Ca<sup>2+</sup> desde los reservorios intracelulares.
- Grupo II: Constituido por los receptores mGlu2 y mGlu3. Están acoplados de forma negativa a la formación de AMPc mediada por adenilato ciclasa.
  - Grupo III: Constituido por los receptores mGlu4, mGlu6, mGlu7 y mGlu8. Están acoplados de forma negativa a la formación de AMPc mediada por adenilato ciclasa.

### 3.2 PROPIEDADES MOLECULARES Y BIOFÍSICAS DE LOS RECEPTORES DE TIPO NMDA

Los receptores de tipo NMDA tienen características específicas que les confieren unas potentes propiedades computacionales. Desde su descubrimiento hace tres décadas, los receptores de tipo NMDA han fascinado a los neurocientíficos por sus diferentes roles en funciones complejas del SNC. En apartados anteriores, se describió que los receptores de tipo NMDA a menudo median procesos de plasticidad sináptica. Su activación participa en la inducción de cambios de larga duración en la estructura y función sináptica, mecanismos propuestos como correlatos celulares de funciones cognitivas superiores (Traynelis et al., 2010).

Los receptores de tipo NMDA presentan una gran diversidad en su composición molecular (subunidades), en sus propiedades biofísicas y farmacológicas, en su interacción con diferentes moduladores alostéricos, así como en su localización subcelular (Cull-Candy y Leszkiewicz, 2004; Paoletti, 2011). La composición en subunidades varía a lo largo del SNC, durante el desarrollo y en estados patológicos (Mony et al., 2009; Paoletti, 2011). Hay también evidencias de que en sinapsis maduras, la composición en subunidades de los receptores de tipo NMDA cambia dependiendo de la actividad neuronal (Barria y Malinow, 2002; Lee et al., 2010b, Matta et al., 2011).

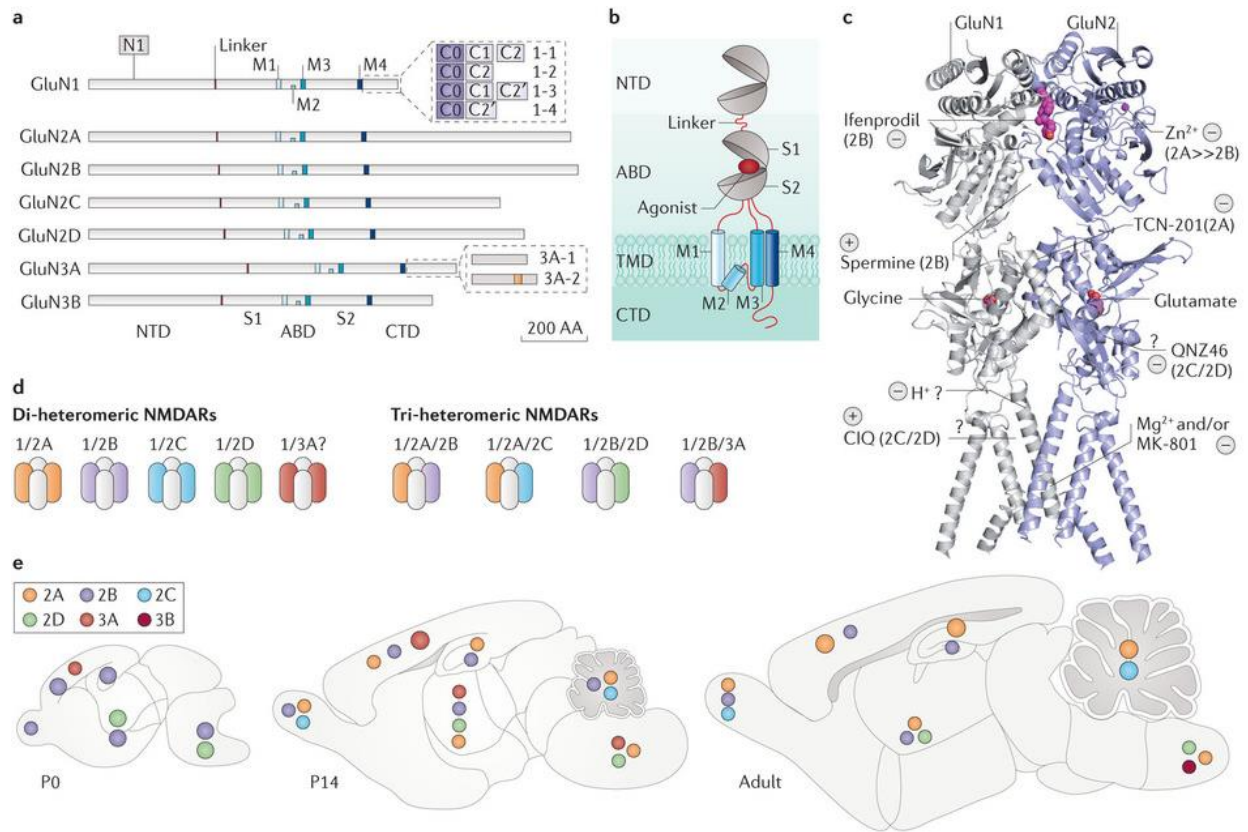
### 3.2.1 FAMILIAS DE SUBUNIDADES: GluN1, GluN2 y GluN3.

La noción de que existen múltiples subtipos de receptores de tipo NMDA, dotados con propiedades distintivas, emerge durante los primeros estudios de patch clamp sobre preparaciones neuronales. Posteriormente, estudios de clonación revelaron que los receptores de tipo NMDA se ensamblan como heterotetrámeros que difieren en su composición en subunidades (Traynelis et al., 2010).

Actualmente, se han identificado siete subunidades que se agrupan en tres familias en función de la homología de sus secuencias: la subunidad GluN1, cuatro subunidades GluN2 (GluN2A, GluN2B, GluN2C y GluN2D), codificadas por 4 genes diferentes, y un par de subunidades GluN3 (GluN3A y GluN3B), que provienen de dos genes diferentes (Fig. 10.A) (Cull-Candy y Leszkiewicz, 2004).

Todas las subunidades comparten una arquitectura modular compuesta por cuatro dominios diferentes: El dominio N-terminal (NTD); el dominio de unión del agonista (ABD), al cual se une Glicina o D-Serina (GluN1 y GluN3) y glutamato (GluN2); el dominio transmembrana (TMD), que contiene el canal iónico; y el dominio C-terminal (CTD). El NTD y el CTD son las regiones más divergentes (Fig. 10.B) (Paoletti, 2011). Las principales diferencias entre las distintas subunidades se pueden explicar casi en su totalidad debido a las diferencias en la longitud del dominio C-terminal intracelular (CTD), región que está implicada en el acoplamiento del receptor a cascadas de señalización y en el tráfico intracelular del mismo (Traynelis et al., 2010).

Los receptores de tipo NMDA funcionan como heterotetrámeros, en los cuales clásicamente se asocian dos subunidades GluN1 con dos subunidades GluN2 o con una mezcla de subunidades GluN2 y GluN3 (Stroebe et al., 2014). Las múltiples opciones de ensamblaje entre las diferentes subunidades homólogas dan lugar a una gran variedad de subtipos de receptores de tipo NMDA en el SNC (Fig. 10.D).



Nature Reviews | Neuroscience

**Figura 10. Diversidad estructural, en subunidades y expresión de los receptores de tipo NMDA. (A)** Se han identificado 7 subunidades diferentes: GluN1, GluN2A-GluN2D y GluN3A-GluN3B. La heterogeneidad dada por la diferente composición en subunidades se ve aumentada por el ajuste alternativo las subunidades GluN1 y GluN3A. M1-M4 indican los segmentos de transmembrana. **(B)** Todas las subunidades GluN comparten una arquitectura modular compuesta por cuatro dominios diferentes: El dominio N-terminal (NTD); el dominio de unión del agonista (ABD), al cual se une Glicina o D-Serina (GluN1 y GluN3) y glutamato (GluN2); el dominio transmembrana (TMD), que contiene el canal iónico; y el dominio C-terminal (CTD). El NTD y el CTD son las regiones más divergentes. **(C)** Los receptores de tipo NMDA albergan múltiples sitios de unión para pequeñas moléculas extracelulares, que actúan como moduladores alostéricos, específicos para cada subunidad. Modelo estructural de un heterodímero GluN1/GluN2B basado en cristalografía de rayos X. Los signos + y - indican moduladores alostéricos positivos y negativos, respectivamente. Los signos de interrogación (?) indican incertidumbre en relación a la localización exacta del sitio de unión. **(D)** Se muestran ejemplos de varias poblaciones de receptores de tipo NMDA (diheteroméricos y triheteroméricos) de las que se ha propuesto su existencia en el SCN. **(E)** Perfil de desarrollo de la expresión de las subunidades GluN en el cerebro de ratón (P0, P14 y adultos). Tomado de Paoletti, 2011.

- Familia GluN1.

La subunidad GluN1 está codificada por un único gen pero tiene ocho isoformas diferentes, lo cual confiere una mayor heterogeneidad a los receptores de tipo NMDA. Existen ocho variantes de procesamiento alternativo para el ARNm de GluN1 (GluN1-1a – GluN1-4a y GluN1-1b – GluN1-4b), que difieren entre sí por la presencia o ausencia de una secuencia de 21 aminoácidos (N1: exón 5) en el dominio N-terminal (NTD), y por el procesamiento diferente de los exones 21 y 22, que da lugar a cambios en la secuencias del CTD (unidades C1, C2 y C2') (Zukin y Bennet, 1995; Holmes et al., 2002). Las modificaciones del NTD cambian las propiedades farmacológicas del receptor (Rumbaugh et al., 2000; Vance et al., 2012), mientras que las modificaciones en el CTD cambian las propiedades de tráfico y ensamblaje de las subunidades del receptor, así como su acoplamiento con cascadas intracelulares (Horak y Wenthold, 2009). El ARNm de la subunidad GluN1 se expresa de manera generalizada en SNC desde los 14 días de desarrollo embrionario (E14) hasta la edad adulta, coincidiendo con la distribución de los receptores de tipo NMDA. (Akazawa et al., 1994; Watanabe et al., 1992). No obstante, hay diferencias específicas en la expresión de las isoformas de GluN1: Mientras que GluN1-2 está ampliamente distribuida, GluN1-1 y GluN1-4 muestran distribuciones complementarias, concentrándose GluN1-1 en regiones más rostrales (incluyendo corteza e hipocampo). Los patrones de distribución de la expresión de las isoformas GluN1-1a y GluN1-1b se solapan, pero su abundancia relativa varía de unas regiones a otras (Laurie y Seeburg, 1994). El significado funcional de la expresión diferencial de las isoformas de la subunidad GluN1 aún no está claro.

- Familias GluN2 y GluN3.

En comparación con la subunidad GluN1, los patrones de expresión, tanto temporales como espaciales de las cuatro subunidades pertenecientes a la familia GluN2, son diferentes, restringiéndose a ciertos núcleos definidos dentro del SNC, cambiando durante su desarrollo (Monyer et al., 1994) (Fig. 10.E). Estas subunidades son los principales determinantes en la diversidad funcional de receptor: sensibilidad, conductancia, cinética de desactivación y de de-sensibilización (Vicini et al., 1998; Erreger et al., 2005; Paoletti, 2011), influyendo directamente en la duración de las corrientes postsinápticas excitadoras.



En el cerebro embrionario, sólo se expresan las subunidades GluN2B y GluN2D, encontrándose esta última principalmente en regiones caudales. Los principales cambios en el patrón de expresión de la subunidades GluN2 ocurren durante las dos primeras semanas postnatales. La expresión de GluN2A comienza poco después del nacimiento y aumenta constantemente hasta llegar a expresarse amplia y abundantemente prácticamente en todas las áreas del SNC en el adulto. Paralelamente a este aumento progresivo en la expresión de GluN2A, la expresión de GluN2D cae notablemente, y en el adulto sólo se expresa a bajos niveles en el diencéfalo y en el mesencéfalo. En contraste con la expresión de GluN2D, la expresión de GluN2B se mantiene a altos niveles tras el nacimiento, culminando alrededor de la primera semana postnatal y restringiéndose progresivamente su expresión al prosencéfalo. Por último, la expresión de GluN2C aparece tarde en el desarrollo (P10), y su expresión está limitada al cerebelo, la glándula pineal y el bulbo olfatorio (Monyer et al., 1994).

Las subunidades GluN3A y GluN3B también muestran diferentes perfiles ontogenéticos (Fig. 10.E). La expresión de GluN3A culmina a una edad postnatal temprana y posteriormente desciende progresivamente. Contrariamente, la expresión de GluN3B aumenta lentamente a lo largo del desarrollo y, en la edad adulta, se expresa a altos niveles en las neuronas motoras y posiblemente en otras regiones (Henson et al., 2010; Pachernegg et al., 2012).

La expresión específica de las subunidades GluN2B, GluN2D y GluN3A en el desarrollo temprano sugiere que estas subunidades son importantes en procesos de sinaptogénesis, maduración y plasticidad sináptica.

### 3.2.2 DIVERSIDAD ESTRUCTURAL DE LOS RECEPTORES DE TIPO NMDA.

De acuerdo con el gran número de subunidades y su expresión conjunta en varias regiones cerebrales, muchos subtipos diferentes de receptores de tipo NMDA coexisten en el SNC. Teniendo en cuenta además las diferentes isoformas de la subunidad GluN1, se han descrito, al menos, una docena de subtipos funcionales diferentes, pero el número exacto puede ser significativamente mayor.

Los receptores de tipo NMDA exhiben propiedades singulares que los distinguen de otros tipos de receptores ionotrópicos dependientes de ligando: 1) El canal del receptor de tipo NMDA está sujeto a un bloqueo por  $Mg^{2+}$  dependiente de voltaje. 2) El canal del receptor de tipo NMDA es altamente permeable al  $Ca^{2+}$ . 3) Estos receptores muestran una cinética lenta inusual. 4) Su activación requiere la presencia tanto de glutamato como de un coagonista (glicina o D-serina) (Johnson y Ascher, 1987; Kleckner y Dingledine, 1988; Le Bail et al, 2015). 5) Poseen múltiples sitios de unión para pequeñas moléculas que le confieren una gran sensibilidad hacia el microambiente extracelular (Fig. 10.C). Cada una de estas propiedades varía en función de la composición en subunidades del receptor. Por ello, la composición en subunidades afecta a las propiedades biofísicas y farmacológicas de estos receptores así como a la ruta de señalización que activará.

Se piensa que todos los subtipos combinan dos copias de la subunidad GluN1 obligatoriamente, más dos copias de las subunidades GluN2 y/o GluN3. Se han descrito ejemplos de subtipos de receptores de tipo NMDA con dos isoformas diferentes GluN1 en el mismo (Sheng et al., 1994). Las otras dos subunidades (no GluN1) que componen el receptor pueden ser idénticas o diferentes, dando lugar a receptores diheteroméricos y triheteroméricos, respectivamente (Fig. 10.D). Los receptores diheteroméricos GluN1/GluN2B y GluN1/GluN2A representan una fracción importante de los receptores de tipo NMDA en juveniles y adultos. Los receptores triheteroméricos GluN1/GluN2A/GluN2B también están presentes en muchas regiones del cerebro adulto, particularmente en el hipocampo y la corteza (desde un 15% a un 50% de la población total de receptores de tipo NMDA) (Al-Hallaq et al., 2007; Gray et al., 2011). Sólo se conocen estimaciones dado que la identificación farmacológica de los receptores triheteroméricos es difícil de establecer. También se han descrito receptores triheteroméricos compuestos por las subunidades GluN1/GluN2A/GluN2C y GluN1/GluN2B/GluN2D (Paoletti, 2011). Los receptores diheteroméricos GluN1/GluN3 pueden generar corrientes excitadoras activadas por glicina (Chatterton et al., 2002; Pina-Crespo et al., 2010), pero se cree que in vivo las subunidades GluN3 participan en complejos triheteroméricos GluN1/GluN2/GluN3 (Henson et al., 2010). Por lo tanto, la incorporación diferencial de las subunidades GluN2 y GluN3 es una fuente principal de diversidad funcional.

Los diferentes subtipos de receptores de tipo NMDA pueden variar en función de los diferentes tipos neuronales en los que se encuentren (Monyer et al., 1994) pero, incluso,

pueden coexistir varios subtipos en neuronas individuales (Shinohara et al., 2008; Zhang y Diamond, 2009; Kumar y Huguenard, 2003). También pueden variar en función a su localización subcelular (localización sináptica o extrasináptica) (Gladding y Raymond, 2011; Papouin et al., 2012). Los receptores de tipo NMDA presinápticos con diferente composición en subunidad pueden localizarse en terminales axónicos y modular la eficacia sináptica (Rodríguez-Moreno y Paulsen, 2008). Finalmente, la heterogeneidad de los subtipos de los receptores de tipo NMDA en el SNC puede verse incrementada aún más por la existencia de estos receptores en astrocitos y oligodendrocitos, con una composición en subunidades atípica (conteniendo las subunidades GluN3 y GluN2C) (Karadottir et al., 2005).

### 3.3 PROPIEDADES BIOFÍSICAS DE LOS RECEPTORES DE TIPO NMDA

La conductancia a nivel de canal único, el bloqueo por  $Mg^{2+}$ , así como la permeabilidad al  $Ca^{2+}$  de los receptores de tipo NMDA están influenciados por la composición en subunidades de los mismos (Cull-Candy y Lezkiewicz, 2004; Paoletti, 2011).

Por ejemplo, los receptores diheteroméricos GluN1/GluN2A o GluN1/GluN2B tienen una conductancia de 50pS, con una alta sensibilidad al bloqueo por  $Mg^{2+}$  (concentración inhibitoria máxima media,  $IC_{50}$ , 15  $\mu M$  a -70 mV) y son permeables al  $Ca^{2+}$  (pCa/pCs de 7.5).

Por el contrario, los receptores diheteroméricos GluN1/GluN2C o GluN1/GluN2D presentan una conductividad (37 pS), una sensibilidad al  $Mg^{2+}$  ( $IC_{50}$  de 80  $\mu M$ ) y una permeabilidad al calcio (pCa/pCs de 4.5) mucho más bajas. Estas diferencias afectan significativamente a la contribución relativa de los distintos subtipos de receptores de tipo NMDA en la integración sináptica y la plasticidad. En las células granulares del cerebelo, los receptores de tipo NMDA que contiene la subunidad GluN2C tienen una sensibilidad muy baja al bloqueo por  $Mg^{2+}$ . Este bloqueo incompleto permite la señalización durante la estimulación a baja frecuencia incluso a potenciales hiperpolarizados (Schwartz et al., 2012).

La incorporación de la subunidad GluN3 tiene como resultado una disminución incluso más dramática de la sensibilidad del receptor al bloqueo por  $Mg^{2+}$ , aunque los valores para la sensibilidad al  $Mg^{2+}$  (y la permeabilidad al  $Ca^{2+}$ ) para los receptores GluN1/GluN2/GluN3 siguen

sin estar claros (Henson et al., 2010; Larsen et al., 2011). Se ha propuesto la presencia de un subtipo de los receptores de tipo NMDA compuesto por las subunidades GluN1/GluN2B/GluN3A en el terminal presináptico de la sinapsis establecida entre las neuronas de la capa 2/3 y las neuronas de la capa 4 en la corteza visual, donde los receptores de tipo NMDA pueden activarse a potenciales hiperpolarizados y en presencia de Ifenprodil, que es un antagonista de los receptores de tipo NMDA que contienen la subunidad GluN2B.

La identidad de la subunidad GluN2 también es crucial para determinar las propiedades de apertura del canal, incluyendo la probabilidad máxima de apertura, la sensibilidad al agonista y la cinética de desactivación (Paoletti et al., 2013). Los receptores diheteroméricos GluN1/GluN2A tienen una mayor probabilidad de apertura que los receptores diheteroméricos GluN1/GluN2B o GluN1/GluN2C y GluN1/GluN2D. Estos dos últimos subtipos sorprendentemente tienen una baja probabilidad de apertura. De todas formas, los receptores que contienen la subunidades GluN1 y GluN2A tienen la sensibilidad al glutamato y a la Glicina. La cinética de desactivación del canal gobierna el tiempo de caída de las corrientes postsinápticas (EPSC, *excitatory postsynaptic current*), el cual también depende de la identidad de la subunidad GluN2. El subtipo GluN1/GluN2A presenta el tiempo de caída más rápido ( $\tau < 30$  ms) (Bidoret et al., 2009) y el subtipo GluN1/GluN2D el más lento (2 seg).

Las cinéticas de desactivación del canal están también influenciadas por la isoforma GluN1 que contenga el receptor. Los subtipos de receptores que contienen las isoformas GluN1-b presentan un tiempo de caída más rápido que los que contienen las isoformas GluN1-a cuando se combinan con GluN2B (Rumbaugh et al., 2000). Las distintas propiedades de apertura del canal, le confieren a cada subtipo de receptor capacidades de transferencia de carga y perfiles de señalización temporal únicos.

La simulación de respuesta sináptica muestra que bajo un régimen de estimulación a baja frecuencia, utilizado típicamente para inducir LTD en la sinapsis CA3-CA1, el subtipo de receptores de tipo NMDA GluN1/GluN2B tiene una mayor contribución a la transferencia de carga total que el subtipo GluN1/GluN2A. Por el contrario, bajo una estimulación tetánica de alta frecuencia, típicamente utilizada para inducir LTP en la misma sinapsis, la transferencia mediada por el subtipo GluN1/GluN2A sobrepasa considerablemente a la transferencia mediada por el subtipo GluN1/GluN2B (Erreger et al., 2005).

Otra fuente de heterogeneidad y complejidad, es la presencia de receptores de tipo NMDA presinápticos. A pesar de la dificultad para registrarlos directamente, se ha mostrado que juegan un papel clave en la plasticidad sináptica en el cerebro. Desafortunadamente, poco se conoce sobre las propiedades de apertura de los receptores triheteroméricos que contienen más de un tipo de subunidades GluN2 o una subunidad GluN2 y una subunidad GluN3. Dos estudios recientes han intentado responder a esta pregunta. Registrando ovocitos de *Xenopus*, que expresan selectivamente en su superficie receptores de tipo NMDA triheteroméricos, Stroebel y colaboradores (2014) establecieron que los receptores triheteroméricos GluN1/GluN2A/GluN2B tienen propiedades farmacológicas y de apertura del canal únicas. Ellos revelaron que la subunidad GluN2A tiene un efecto dominante sobre las propiedades del receptor, el fenotipo de GluN2B únicamente es dominante para la sensibilidad por la glicina y la sensibilidad al zinc es intermedia entre GluN2A y GluN2B. Por el contrario, Hansen y colaboradores (2014) concluyeron que el zinc (pero no el ifenprodil) inhibe a los receptores diheteroméricos y triheteroméricos de igual manera.

La caracterización de las distintas combinaciones en la composición en subunidades de los receptores de tipo NMDA ayudará a comprender la transmisión sináptica y la plasticidad en el cerebro.

### **3.4 MODULADORES ENDÓGENOS DE LOS RECEPTORES DE TIPO NMDA.**

En el SNC se han encontrado numerosas sustancias endógenas, tales como protones, poliaminas y  $\text{Zn}^{2+}$ , que actúan como potentes moduladores de los receptores de tipo NMDA (Paoletti, 2011). Las poliaminas están presentes tanto en el medio intracelular como en el medio extracelular. Estas pueden secretarse tras la activación de los receptores de tipo NMDA en condiciones fisiológicas (Fage et al., 1992) o en condiciones patológicas (Paschen et al., 1992). El miembro más estudiado de esta familia es la espermina. La espermina puede estar involucrada, parcialmente, en la disminución de la inhibición tónica debida a protones, observada sobre receptores de tipo NMDA que contienen el exón 5 (Traynelis et al., 1995). Esta inhibición alcanza valores de casi el 50% a un pH fisiológico (pH 7.3 - 7.5).

La sensibilidad a estos moduladores está fuertemente influenciada por la composición en subunidades del receptor. Los protones inhiben preferentemente a los receptores de tipo NMDA que contienen la subunidad GluN2B o la subunidad GluN2D (Banke et al., 2005), mientras que las poliaminas extracelulares potencian significativamente a los receptores que contienen la subunidad GluN2B (Mony et al., 2011). Curiosamente, esta potenciación se pierde en los receptores que contienen las isoformas GluN1-b (Traynelis et al., 2010).

En contraste, el ión zinc actúa como un antagonista altamente específico de los receptores GluN1/GluN2A. Tanto el NTD de la subunidad GluN2A como el de la GluN2B contienen sitios de unión para el  $Zn^{2+}$  (Ratchline et al., 2005) pero la diferencia en la afinidad es tal que cuando se aplican concentraciones bajas de  $Zn^{2+}$  ( $< 1 \mu M$ ), sólo se afectan los receptores que contienen la subunidad GluN2A (Bidoret et al., 2009; Nozaki et al., 2011; Vergnano et al., 2014).

Cada vez existe un número mayor de elementos farmacológicos que pueden discriminar entre los diferentes subtipos de receptores de tipo NMDA. Los compuestos mejor caracterizados son el ifenprodil y sus derivados (tal como Ro25-6981) los cuales son compuestos sintéticos que actúan selectivamente sobre receptores de tipo NMDA que contienen la subunidad GluN2B (Karakas et al., 2011). La sensibilidad opuesta de los receptores que contienen GluN2A y los receptores que contienen GluN2B al  $Zn^{2+}$  y al ifenprodil se ha utilizado clásicamente para distinguir entre este tipo de receptores (Papouin et al., 2012; Rodenas-Ruano et al., 2012) aunque la presencia de receptores triheteroméricos complica la interpretación de los resultados, como vimos anteriormente. De hecho, los receptores GluN1/GluN2A/GluN2B unen tanto  $Zn^{2+}$  como ifenprodil con alta afinidad pero la máxima inhibición es débil (20%) (Hatton y Paoletti 2005). Por tanto, la baja sensibilidad al ifenprodil no necesariamente significa que la subunidad GluN2B esté ausente, pudiendo ser indicativo de un coensamblaje de la misma con otras subunidades.

Otros factores también afectan a las propiedades de los receptores de tipo NMDA. El esteroide neuroactivo sulfato de pregnenolona actúa sobre el dominio modulador de los receptores de tipo NMDA que contienen la subunidad GluN2A y GluN1-b tal como se describió descrito para los protones (Kostakis et al., 2011). Los lisofosfolípidos o el ácido araquidónico alteran la función de los receptores de tipo NMDA mediante inserción en la bicapa lipídica

(Casado y Ascher, 1998; Kloda et al., 2007). Compuestos con una gran cabeza hidrofílica (como los lisofosfolípidos) imitan los efectos de una compresión, y compuestos con una pequeña cabeza hidrofílica (como el ácido araquidónico) imitan los efectos de un estiramiento. Aunque como estos compuestos no son específicos para los receptores de tipo NMDA, estudios funcionales en tejidos pueden ser muy difíciles de interpretar.

El modulador endógeno mejor descrito en condiciones fisiológicas es el  $Zn^{2+}$ . El grupo de Pierre Paoletti y colaboradores han mostrado que el  $Zn^{2+}$  es un modulador endógeno de la neurotransmisión excitadora *in vitro* e *in vivo*. Recientemente han mostrado que tras trenes cortos de estimulación sináptica, relevante fisiológicamente, aumentan transitoriamente los niveles de  $Zn^{2+}$  en la hendidura sináptica e inhibe selectivamente a los receptores de tipo NMDA que contienen la subunidad GluN2A postsinápticos, produciendo cambios en la integración sináptica (Vergnano et al., 2014).

### 3.5 RECEPTORES DE TIPO NMDA PRESINÁPTICOS IMPLICADOS EN PLASTICIDAD.

La activación de los receptores de tipo NMDA presinápticos está implicada en la modulación de la liberación espontánea del neurotransmisor, así como de la liberación provocada por la actividad sináptica y de los efectos de larga duración sobre la transmisión sináptica. Los receptores presinápticos dotan a la sinapsis de nuevas y únicas reglas de plasticidad. Se ha propuesto que estos receptores actúan como autorreceptores en muchas estructuras.

Nicola Berretta y Ronald Jones, en 1996, fueron los primero que publicaron que los receptores de tipo NMDA también podían estar localizados en el terminal presináptico en un estudio realizado en la capa 2 de la corteza entorrinal de rata. Ellos encontraron que tras la aplicación de D-AP5, la frecuencia de las corrientes postsinápticas excitadoras miniatura (mEPSCs) disminuyó, incluso, cuando los receptores de tipo NMDA postsinápticos estaban bloqueados mediante la inclusión de MK801 (inhibidor de los receptores de tipo NMDA) en la célula postsináptica. Posteriormente, se encontró que la aplicación en el baño de ifenprodil

potenciaba los mEPSCs en la sinapsis Capa 2 - Capa 5 en la corteza entorrinal (Woodhall et al., 2001).

Cada vez hay más estudios que demuestran la implicación de los receptores de tipo NMDA presinápticos en la plasticidad sináptica en numerosas regiones del cerebro.

- En la sinapsis CA3-CA1 se ha observado facilitación presináptica y LTP expresada presinápticamente mediada por receptores de tipo NMDA que actúan como autorreceptores, óptima a frecuencias theta, rango que frecuentemente está involucrado en el almacenamiento de la memoria (Larson y Munkacsy, 2014).
- Los receptores presinápticos de tipo NMDA participan en la inducción en algunas formas de plasticidad sináptica de larga duración en la corteza cerebral. Se ha observado que están involucrados en la inducción de la t-LTD en la sinapsis Capa 2/3 – Capa 4, en la corteza somatosensorial de ratón (Rodríguez-Moreno y Poulsen, 2008), así como en la inducción de la t-LTD en la Capa 4 de la corteza visual de animales jóvenes (Sjöström et al., 2001; Buchanan et al., 2012). A pesar de que estas formas de plasticidad sináptica son dependientes de este tipo de receptores, la composición en subunidades de los mismos difiere. En algunas ocasiones, los protocolos requeridos para inducir plasticidad están determinados por las propiedades biofísicas de los receptores de tipo NMDA y su composición en subunidades. En particular, la dependencia de la frecuencia de la t-LTD puede deberse a la necesidad de disminuir el bloqueo por  $Mg^{2+}$  a través de una despolarización dependiente de actividad. Éste puede ser el caso para la dependencia de frecuencia observada en la Capa 4 de la corteza entorrinal (Woodhall et al., 2001; Yang et al., 2006; Chamberlain et al., 2008).
- En el cerebelo, la sinapsis establecida entre las fibras paralelas y las células de Purkinje expresan una forma de LTD que es dependiente de la activación de receptores presinápticos de tipo NMDA (Casado et al., 2002). En esta sinapsis el glutamato se une a este receptor, el cual actúa como un autorreceptor. Durante el tiempo que el glutamato está unido al receptor y promueve su apertura, el  $Mg^{2+}$  puede bloquear su permeabilidad. La entrada de  $Ca^{2+}$  a través de los receptores de tipo NMDA sólo ocurre si las fibras paralelas disparan de nuevo antes de que se disocie el glutamato del



receptor. Esto puede establecer una regla de plasticidad que selecciona altas frecuencias de disparo en el elemento presináptico. De hecho, sólo la actividad en trenes a más de 40 Hz da lugar a LTD. Esta alta frecuencia puede estar determinada por la rápida cinética del desacoplamiento del glutamato que viene dada por la subunidad GluN2A presente en los receptores de tipo NMDA en las fibras paralelas (Bidoret et al., 2009).

- Samson y Paré (2005) sugirieron que en la amígdala central, la LTP expresada presinápticamente sólo ocurre cuando las aferencias corticales tienen una actividad a alta frecuencia, la cual también se requirió en la amígdala lateral (Humeau et al., 2003). Se ha mostrado que ambas formas de LTP dependen de receptores presinápticos de tipo NMDA y aunque ha sido publicado que el óxido nítrico puede jugar un papel en la inducción de la t-LTP convencional en las entradas talámicas y la adquisición del condicionamiento del miedo (Ota et al., 2008; Schafe et al., 2005), el papel del NO sobre la plasticidad sináptica en las entradas corticales se sigue debatiendo hoy día (Shin et al., 2010; Shin et al., 2013)

Los receptores de tipo NMDA presinápticos dotan a las redes neuronales de propiedades únicas y originales reglas de plasticidad. Estos receptores parecen jugar un papel importante sobre la maduración de las redes neuronales durante el desarrollo temprano del cerebro, pero también pueden estar presentes y modular la transmisión sináptica en algunas sinapsis en tejidos maduros.

## II. Objetivos

## II. OBJETIVOS

### 1. OBJETIVO GENERAL.

Determinar los mecanismos celulares involucrados en la inducción y la expresión de la Spike timing-dependent plasticity en la sinapsis establecida entre las colaterales de Schaffer (CA3) y las células piramidales de la región CA1 en el hipocampo de ratón.

### 2. OBJETIVOS CONCRETOS.

1. Determinar la existencia de STDP (t-LTP y t-LTD) en la establecida entre las colaterales de Schaffer (CA3) y las células piramidales de la región CA1.

2. Determinar el perfil de desarrollo de la STDP, tanto de la t-LTP como de la t-LTD, inducida mediante protocolos de apareamiento de la actividad presináptica con una única espiga postsináptica a baja frecuencia en la establecida entre las colaterales de Schaffer (CA3) y las células piramidales de la región CA1.

3. Determinar si la inducción de la t-LTP y de la t-LTD requiere de la activación de receptores de glutamato de tipo NMDA en la establecida entre las colaterales de Schaffer (CA3) y las células piramidales de la región CA1.

4. Determinar la localización, pre- o postsináptica, así como la composición en subunidades de los receptores de tipo NMDA involucrados en la t-LTP y en la t-LTD en la establecida entre las colaterales de Schaffer (CA3) y las células piramidales de la región CA1.

5. Determinar el mecanismo de acción de la inducción de t-LTD: los requerimientos de calcio, los sistemas de receptores y las rutas intracelulares involucrados en la establecida entre las colaterales de Schaffer (CA3) y las células piramidales de la región CA1.

6. Determinar el locus de expresión de la t-LTD en la establecida entre las colaterales de Schaffer (CA3) y las células piramidales de la región CA1.

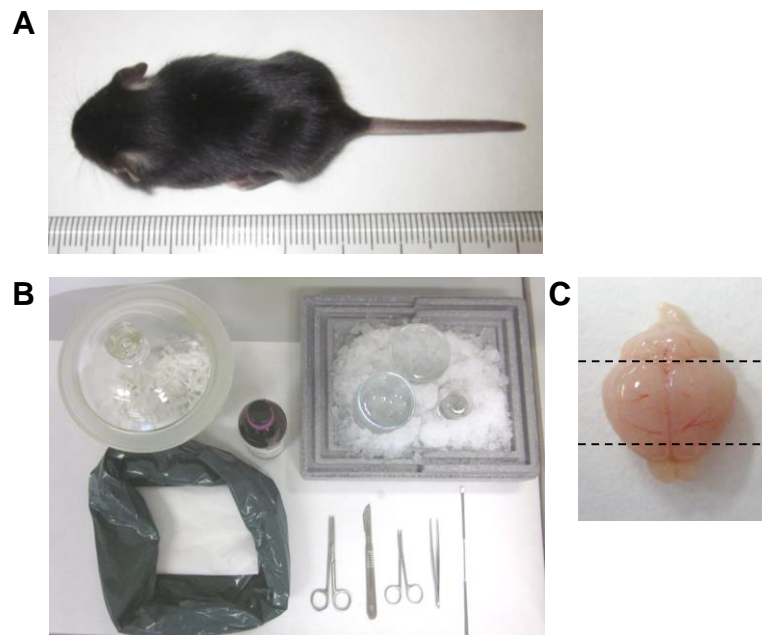
### III. Materiales y métodos

### III. MATERIALES Y METODOS

1. ANIMALES .....	45
2. OBTENCIÓN DEL TEJIDO .....	46
3. REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS .....	47
3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	47
3.2 REGISTRO DE POTENCIALES POSTSINÁPTICOS EXCITADORES PROVOCADOS.....	48
4. PROTOCOLOS EMPLEADOS EN LOS EXPERIMENTOS .....	51
4.1 PROTOCOLOS PARA INDUCIR SPIKE TIMING-DEPENDENT PLASTICITY .....	51
4.2 PROTOCOLO DE ESTIMULACIÓN POR PARES DE PULSOS.....	51
5. ANÁLISIS DE DATOS .....	52
6. FARMACOLOGÍA .....	53

## 1. ANIMALES.

Los experimentos descritos en la presente memoria se han llevado a cabo en rodajas obtenidas del cerebro de ratones C57Bl/6 de edades comprendidas entre 4 y 120 días (P4 - P120, tomando como P0 el día de nacimiento) (Fig. 11.A). Todos los procedimientos se realizaron teniendo en cuenta la directiva de la Unión Europea (609/86/EU) para el uso de animales de laboratorio en experimentos agudos y fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad Pablo de Olavide.



**Figura 11. Extracción del cerebro.** (A) Sujeto experimental, ratón C57Bl/6 de edad P15. (B) Cámara donde se anestesiaron los ratones y material utilizado para la extracción del cerebro. (C) Extraído el cerebro, se eliminó la parte anterior y posterior (líneas discontinuas).

## 2. OBTENCION DEL TEJIDO.

Los animales se anestesiaron con Isoflurano y se sacrificaron por decapitación para posteriormente extraer el cerebro (Fig. 11.B y C), colocándolo en una solución *ringer* fría (0-4 °C) cuya composición es similar a la del líquido cerebroespinal (Tabla 1). Esta solución fue burbujeada continuamente con carbógeno (95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>).

Se extrajo el cerebro y se fijó a la plataforma de un vibratomo (Leica, modelo VT 1000S) (Fig. 12.A), manteniendo el tejido en todo momento en *ringer* frío (Fig. 12.B). Se obtuvieron rodajas hipocampales coronales de 350 µm de grosor. Las rodajas se colocaron para su recuperación en una cámara de incubación con *ringer* a temperatura ambiente continuamente oxigenado (Fig. 12.C), donde permanecieron al menos 1 hora antes de su uso.

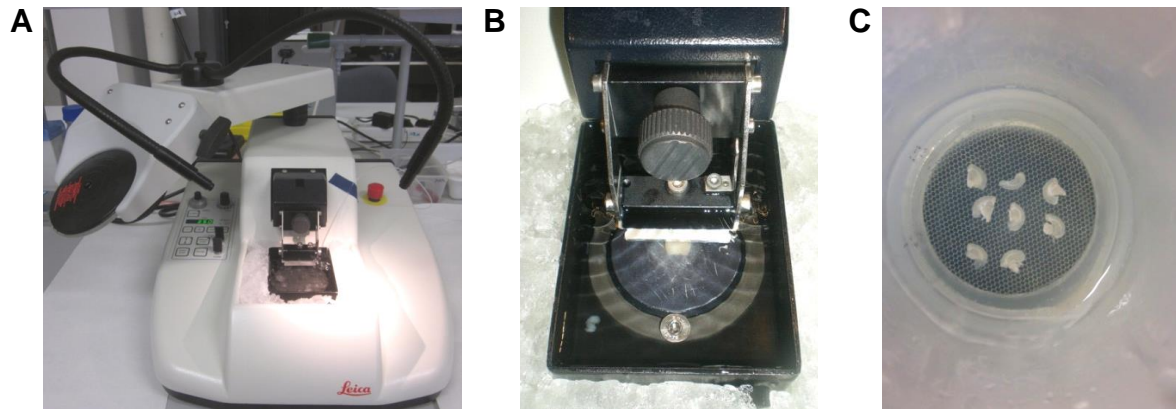
STOCK I				
SUSTANCIA	PESO MOLECULAR	CONCENTRACIÓN (mM)	1x (g/l)	10x (g/l)
NaCl	58,44	126,00	7,363	73,63
KCl	74,56	3,00	0,224	2,24
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	156,01	1,25	0,195	1,95
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	246,50	2,00	0,493	4,93
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	147,00	2,00	0,294	2,94
Glucosa	180,20	10,00	1,802	18,02

STOCK II				
SUSTANCIA	PESO MOLECULAR	CONCENTRACIÓN (mM)	1x (g/l)	10x (g/l)
NaHCO <sub>3</sub>	84,01	24,00	2,016	20,16

**Tabla 1. Composición de la solución extracelular.** Se prepararon dos *stocks* a partir de los cuales se elaboró diariamente solución extracelular, o *ringer*, empleada en el mantenimiento de las rodajas.





**Figura 12. Preparación de rodajas.** (A) Vibratomo utilizado, Leica, modelo VT 1000S. (B) El cerebro se fijó a la plataforma del vibratomo y se cortó en rodajas de 350  $\mu\text{m}$  de grosor. (C) Las rodajas se mantuvieron en una cámara a temperatura ambiente y continuamente oxigenadas durante al menos una hora antes de su uso.

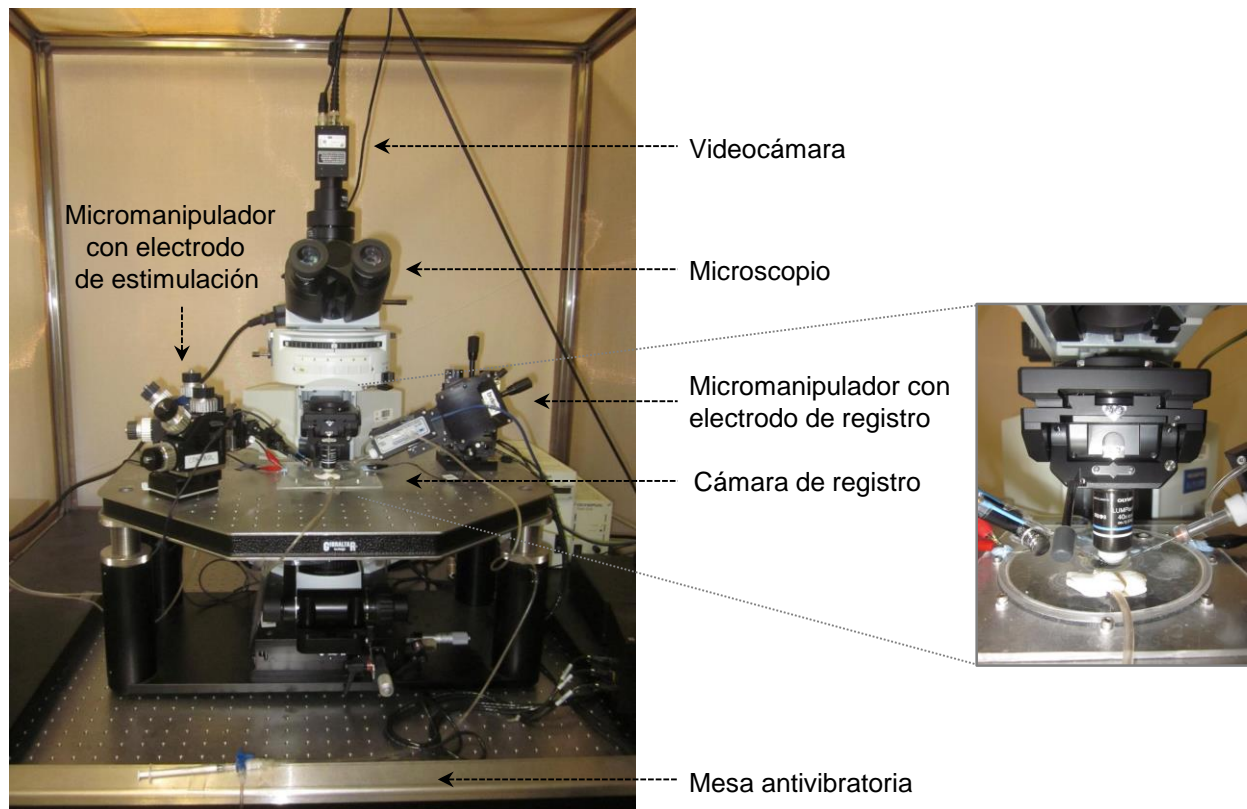
### 3. REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS.

#### 3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL.

Una vez que la rodaja se colocó en la cámara de registro (Fig. 13), ésta estuvo en contacto continuo con solución extracelular (*ringer*) oxigenada, a una tasa de perfusión que dependió del experimento en curso.

Los experimentos se llevaron a cabo empleando la técnica de *patch-clamp* en su configuración de célula completa (*whole cell*) en el modo *current clamp*, a temperatura ambiente.

La región CA1 del hipocampo se localizó con ayuda del microscopio (Olympus, modelo BX51WI), bajo un objetivo de inmersión 10X. La célula a registrar se eligió de forma visual, atendiendo a su posición en el hipocampo y a su forma piramidal característica, con la ayuda del objetivo de inmersión 40X del microscopio utilizado (Fig. 13). Adicionalmente, las células se identificaron según su patrón de disparo característico.



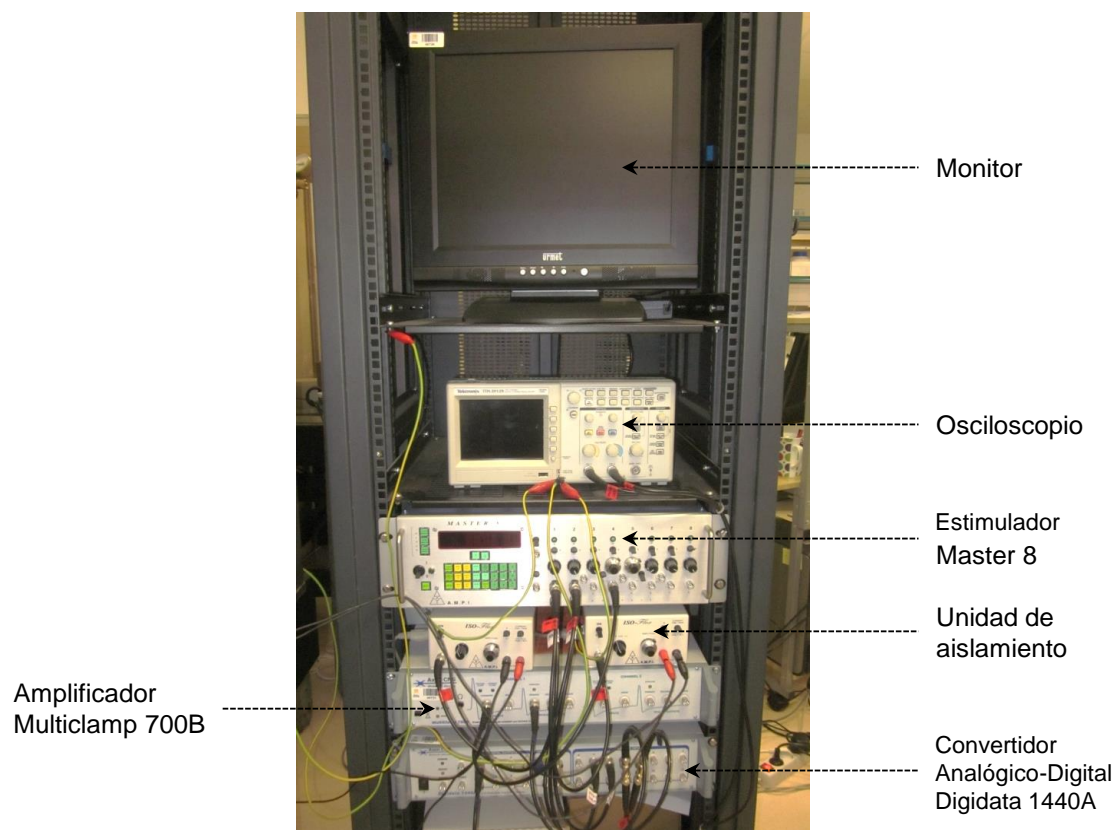
**Figura 13.** Microscopio con los distintos elementos que hicieron posible la colocación de la rodaja y su mantenimiento, la sujeción de los electrodos y la localización de las zonas de estimulación y registro. Una vez que la rodaja estuvo en la cámara de registro, continuamente bañada en la solución extracelular gracias a una bomba peristáltica, se localizaron las zonas de estimulación y registro y se colocaron los electrodos con ayuda del microscopio y los micromanipuladores.

### 3.2 REGISTRO DE POTENCIALES POSTSINÁPTICOS EXCITADORES PROVOCADOS (EPSPs).

Las pipetas de registro se fabricaron a partir de un capilar de vidrio borosilicato (con el estirador de pipetas horizontal P-97, Sutter Instruments) y se llenaron con una solución intracelular basada en gluconato (Tabla 2). Una vez rellenas con dicha solución, las pipetas de registro tuvieron una resistencia de 5-7 MΩ.

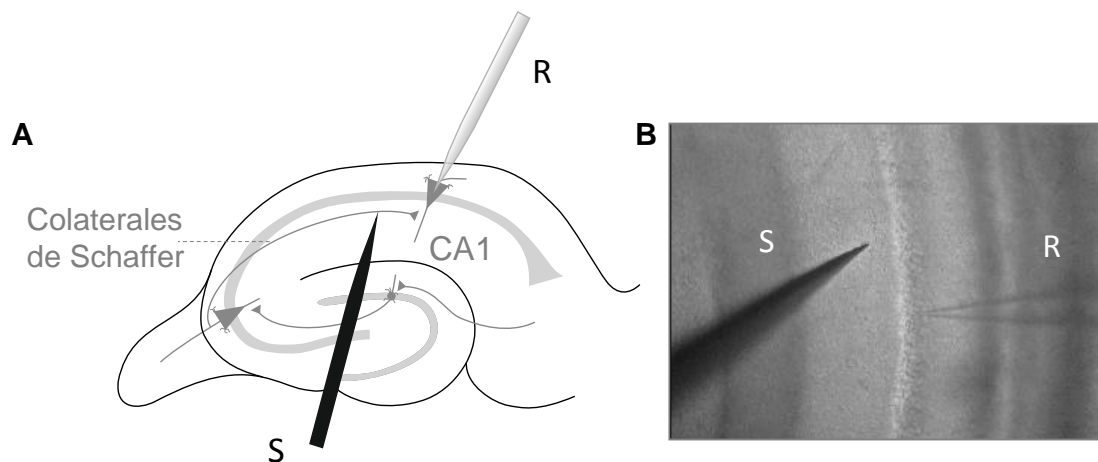
SUSTANCIA	PESO MOLECULAR	CONCENTRACIÓN (mM)	PESO (mg)/50 mL)
Potassium D-guconate ( $C_6H_{11}KO_7$ )	234,25	110,00	1288,38
HEPES Minimum 99,5% titration ( $C_8H_{18}N_2O_4S$ )	238,30	40,00	476,60
ATP-Mg	507,18	4,00	101,44
GTP Sodium Salt	523,00	0,30	7,85
NaCl	58.44	4,00	11,69

**Tabla 2. Composición de la solución interna.** Solución empleada para llenar la pipeta de vidrio cuando se realizaron experimentos mediante la técnica de Patch Clamp en su configuración de célula completa (*Current clamp*).



**Figura 14. Equipamiento que hizo posible la realización de los experimentos.** Se muestran los distintos equipos que se utilizaron para estimular y registrar las rodajas.

Para provocar los EPSPs se aplicaron pulsos eléctricos a través de un electrodo de acero inoxidable monopolar empleando un estimulador (Master 8, A.M.P.I.), que controla la duración y la frecuencia del pulso eléctrico, y una unidad de aislamiento (ISOflex, A.M.P.I.) que controla la amplitud de dicho pulso. El electrodo de estimulación se colocó sobre las colaterales de Schaffer (en el *Stratum radiatum*) (Fig. 15). Adicionalmente, en la mayoría de los experimentos,, se colocó un segundo electrodo de estimulación sobre las colaterales de Schaffer, obteniendo así una ruta control donde los protocolos no fueron aplicados.



**Figura 15. Ubicación de los electrodos. (A)** Vista esquematizada. El electrodo de estimulación (S) se colocó sobre los axones de las neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo (colaterales de Schaffer). El electrodo de registro (R) se colocó sobre el soma de una neurona piramidal de la región CA1 del hipocampo. **(B)** Imagen real tomada a 10X.

Los registros se obtuvieron con un amplificador Multiclamp 700B (Molecular Devices). (Fig. 14). Las señales se filtraron a 2 KHz y se adquirieron a 10 KHz para almacenarlos en un ordenador y analizarlos posteriormente “off line”. Para ello se empleó el paquete de programas pClamp 10.2 (Molecular Devices).

Durante la realización de los experimentos, se observó en todo momento la resistencia en serie, y se descartaron todos aquellos experimentos en los que se produjo un cambio de resistencia superior al 15% a lo largo del mismo.

## 4. PROTOCOLOS EMPLEADOS EN LOS EXPERIMENTOS.

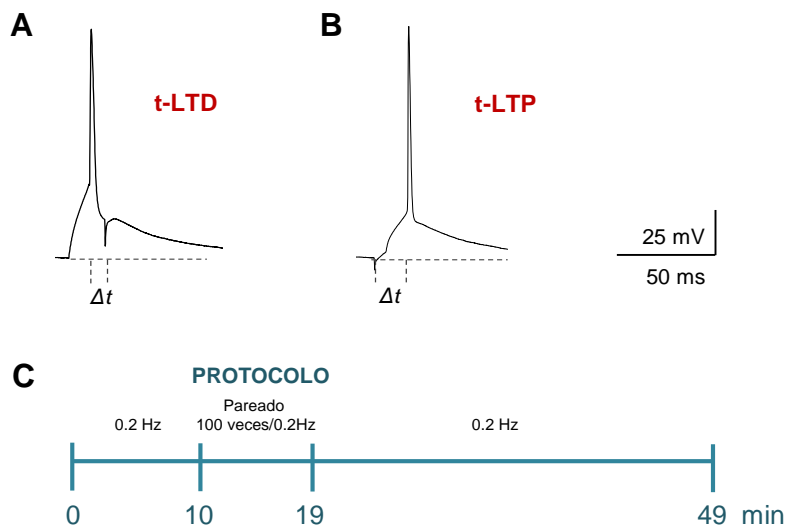
### 4.1 PROTOCOLOS PARA INDUCIR SPIKE TIMING-DEPENDENT PLASTICITY.

Para el estudio de la Spike timing-dependent plasticity en la sinapsis establecida entre las colaterales de Schaffer y las células piramidales de la región CA3 del hipocampo, se colocaron dos electrodos de estimulación sobre las colaterales de Schaffer (evitando que dichos electrodos estimularan las mismas fibras). Un electrodo fue utilizado para estimular la ruta experimental (test) mientras que el otro se empleó para estimular la ruta control. Los EPSPs fueron provocados alternativamente en las dos rutas, a una frecuencia 0.2 Hz en ambas, mediante breves pulsos de corriente. La intensidad del estímulo fue ajustada para obtener EPSPs monosinápticos con una amplitud entre 3 y 8 mV.

Se registraron EPSPs durante un periodo estable de 10 minutos a una frecuencia de 0.2 Hz (línea base). Seguidamente se aplicó el protocolo de plasticidad, únicamente en la ruta experimental, pareando 100 veces los EPSPs provocados con una espiga postsináptica (inyectando pulsos de corriente en la neurona postsináptica a través de la pipeta de patch) (Fig. 16). La frecuencia de estimulación se mantuvo constante durante los experimentos.

Para inducir t-LTD, el potencial de acción postsináptico fue provocado 12 ms antes del inicio del EPSP (protocolo de pareamiento post-pre) (Fig. 16.A). Para inducir t-LTP, el potencial de acción postsináptico fue provocado 10 ms después del inicio del EPSP (protocolo de pareamiento pre-post) (Fig. 16.B).

Los EPSPs fueron monitorizadas al menos durante 30 minutos después de aplicar el protocolo de plasticidad (Fig 16.C).



**Figura 16. Diagrama de los protocolos utilizados para la inducción de STDP y curso temporal de los experimentos. (A)** El protocolo de pareamiento post-pre induce t-LTD.  $\Delta t$  es el intervalo temporal entre el pico de la espiga postsináptica y el comienzo del EPSP. **(B)** El protocolo de pareamiento pre-post induce t-LTP. **(C)** Curso temporal de los experimentos: se registraron EPSPs a una frecuencia de 0.2 Hz; tras un periodo estable de 10 minutos, se aplicó el protocolo de pareamiento (100 veces) a la misma frecuencia; una vez finalizado el protocolo se registraron EPSPs durante al menos 30 minutos.

#### 4.2 PROTOCOLO DE ESTIMULACIÓN POR PARES DE PULSOS.

El protocolo de estimulación por pares de pulsos, necesario para analizar el cambio en el PPR, consistió en aplicar 2 pulsos separados 40 ms, durante 30 segundos. Este protocolo se aplicó durante el inicio del registro de la línea base y a los 30 minutos de la aplicación del protocolo de STDP.

#### 5. ANÁLISIS DE DATOS.

El análisis de los datos obtenidos se realizó con el programa Clampfit (del paquete pClamp, v. 10.2, Molecular Devices) y los gráficos se hicieron utilizando el programa SigmaPlot 11.

Para estimar los cambios en la eficacia sináptica en los experimentos de inducción de STDP se analizó la pendiente (y la amplitud) de los EPSPs durante los últimos 5 minutos de registro y se compararon con la línea base (últimos cinco minutos antes de aplicar el protocolo).

El PPR se expresó como la pendiente del segundo EPSP dividida entre la pendiente del primer EPSP siendo evaluado en situación control y después de la aplicación del protocolo de pareamiento en las diferentes condiciones experimentales.

Para el análisis del Coeficiente de Variación libre de ruido (CV) se utilizó el método descrito previamente por Rodríguez-Moreno *et al.*, (1997), aplicando la siguiente fórmula:

$$CV = \frac{\sqrt{\delta^2(\text{EPSC}) - \delta^2(\text{ruido})}}{\text{Amplitud}_{(\text{EPSC})}}$$

Para determinar el número de fallos en la transmisión sináptica, se evaluó el cambio en el número de fallos en situación control y después de la aplicación del protocolo de pareado en las diferentes condiciones experimentales.

Los datos obtenidos se expresaron como medias  $\pm$  EEM (error estándar de la media) y la significación estadística de las diferencias entre los distintos grupos evaluada a un nivel de  $p < 0.05$ , ó  $p < 0.01$  empleando la prueba  $t$  de Student.

## 6. FARMACOLOGÍA

Los diferentes compuestos farmacológicos se adquirieron en las siguientes compañías: Sigma Aldrich (BAPTA, heparina, MPEP, taspigargina, tricina y cloruro de zinc) Tocris Bioscience (Nimodipina, (+)-MK801 maleato, D-APV, PPDA, Ro256981 maleate) y Abcam (UBP141). Los compuestos se disolvieron en agua en la mayoría de los casos. Cuando esto no fue posible el compuesto se disolvió primero en DMSO (concentración final  $\sim 1\%$  v/v DMSO).

Cuando se determinó el efecto de un agente farmacológico sobre la plasticidad, todas las sustancias se añadieron al baño o se incluyeron dentro de la célula postsináptica utilizando la pipeta de patch desde el inicio del experimento hasta su finalización.

Las sales utilizadas para la solución interna y la solución externa (ringer) se adquirieron de Sigma Aldrich.



## IV. Resultados

## IV. RESULTADOS

### Capítulo 1

<b>1. INDUCCIÓN Y PERFIL DE DESARROLLO DE LA SPIKE TIMING-DEPENDENT PLASTICITY (STDP).....</b>	<b>57</b>
<b>1.1 INDUCCIÓN DE LA STDP EN LA SINAPSIS ESTABLECIDA ENTRE LAS COLATERALES DE SCHAFER Y LAS CÉLULAS PIRAMIDALES DE CA1 EN EL HIPOCAMPO DE RATÓN .....</b>	<b>58</b>
1.1.1 EL PROTOCOLO PRE-POST INDUCE t-LTP .....	58
1.1.2 EL PROTOCOLO POST-PRE INDUCE t-LTD .....	60
<b>1.2 PERFIL DE DESARROLLO DE LA STDP EN LA SINAPSIS ESTABLECIDA ENTRE LAS COLATERALES DE SCHAFER Y LAS CÉLULAS PIRAMIDALES DE CA1 EN EL HIPOCAMPO DE RATÓN.....</b>	<b>60</b>
1.2.1 PERFIL DE DESARROLLO DE LA t-LTP .....	62
1.2.2 PERFIL DE DESARROLLO DE LA t-LTD .....	62

## 1. INDUCCIÓN Y PERFIL DE DESARROLLO DE LA SPIKE TIMING-DEPENDENT PLASTICITY (STDP).

La STDP es un fuerte candidato a ser uno de los mecanismos celulares implicados en el refinamiento de los circuitos neuronales durante el desarrollo, así como en los procesos de memoria y aprendizaje en adultos (Capporale y Dan, 2008; Dan y Poo, 2004).

Este mecanismo ha sido estudiado en multitud de organismos, desde insectos hasta humanos, así como en multitud de regiones cerebrales y diferentes tipos neuronales (Abbott y Nelson, 2000; Sjöström et al., 2008; Caporale y Dan, 2008; Feldman, 2012; Markram et al., 2012). Actualmente, se conocen en profundidad los mecanismos celulares que subyacen a la STDP en regiones corticales (Bender et al., 2006; Brasier y Feldman, 2008; Rodríguez-Moreno y Paulsen, 2008; Urban-Ciecko et al., 2014) entre otras, pero es sorprendente lo poco que se conoce aún sobre las reglas que gobiernan la STDP en el hipocampo, siendo el hipocampo una de las estructuras donde más estudios de plasticidad se han realizado (Bliss y Collingridge, 1993; Malenka y Bear, 2004) y dada su importancia en los procesos de memoria y aprendizaje.

La forma en que la t-LTP y la t-LTD se desarrollan durante el desarrollo temprano, y si se mantienen a través de la edad adulta en la dicha estructura, sigue aún sin respuesta.

El objetivo del presente capítulo es estudiar el perfil de desarrollo de la STDP en la sinapsis establecida entre las colaterales de Schaffer y las células piramidales de CA1 en el hipocampo de ratón, así como corroborar la inducción bidireccional de la misma mediante un protocolo de apareamiento de la actividad presináptica con una única espiga postsináptica a baja frecuencia.

### 1.1 INDUCCIÓN DE LA STDP EN LA SINAPSIS ESTABLECIDA ENTRE LAS COLATERALES DE SCHAFER (CA3) Y LAS CÉLULAS PIRAMIDALES DE CA1 EN EL HIPOCAMPO DE RATÓN.

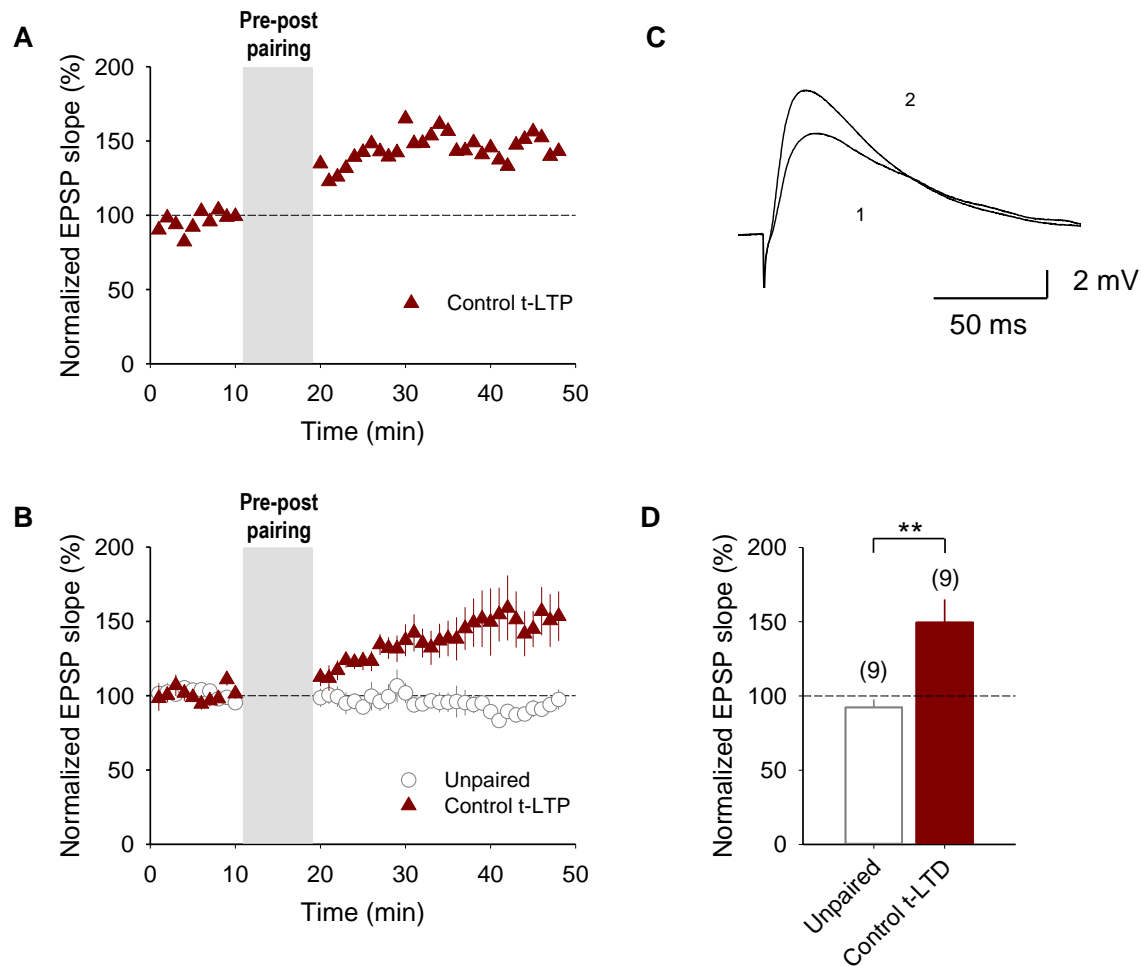
Para llevar a cabo el siguiente estudio, se registraron EPSPs de las neuronas piramidales de CA1 mediante la técnica de patch clamp (*current clamp*) en su configuración de célula completa, provocados mediante la estimulación extracelular de las colaterales de Schaffer.

Se registraron EPSPs durante un periodo estable de 10 minutos a una frecuencia de 0.2 Hz (línea base). Seguidamente se aplicó el protocolo de inducción, pareando EPSPs con una única espiga postsináptica (aplicando pulsos de corriente en la neurona postsináptica a través de la pipeta de patch) 100 veces a una frecuencia de 0.2 Hz. Una vez aplicado el protocolo, se monitorizaron los EPSPs durante al menos 30 minutos. Simultáneamente, fue monitorizada la ruta control, en el cual, el protocolo de plasticidad no se aplicó.

#### 1.1.1 EL PROTOCOLO PRE-POST INDUCE t-LTP.

La aplicación del protocolo de pareamiento pre-post (estimulación presináptica seguida por un potencial de acción postsináptico 10 ms después) provocó t-LTP en todas las neuronas piramidales registradas pertenecientes a ratones con una edad comprendida entre P12 y P18 ( $149 \pm 16\%$ ;  $n = 9$ ), mientras que la ruta control permaneció inalterada ( $92 \pm 5\%$ ;  $n = 9$ ) (Fig. 17).

Estos resultados indican que se puede inducir t-LTP en la sinapsis establecida entre las colaterales de Schaffer y las células piramidales de CA1 en el hipocampo de ratón, en animales con una edad comprendida entre P12-P18, estimulando a baja frecuencia y pareando con una sola espiga postsináptica.



**Figura 17. Inducción de t-LTP en la sinapsis CA3-CA1.** (A, B) El protocolo de pareamiento pre-post induce t-LTP. (A) Ejemplo del curso temporal de la ruta experimental en una única célula piramidal de CA1. (B) Curso temporal de la ruta experimental (triángulos rojos) y la ruta control (círculos blancos) de todas las células piramidales registradas. (C) Registros de EPSPs. Las trazas muestran un EPSP representativo antes (1) y 30 minutos después (2) de la aplicación del protocolo de pareamiento (D) Cuantificación de los resultados. Sobre cada barra se indica entre paréntesis el número de células de cada experimento. Los resultados están expresados en valores medios  $\pm$  el error estándar de la media (EEM) (\*\* $p < 0.01$ ; test *t de Student*).

### 1.1.2 EL PROTOCOLO POST-PRE INDUCE t-LTD.

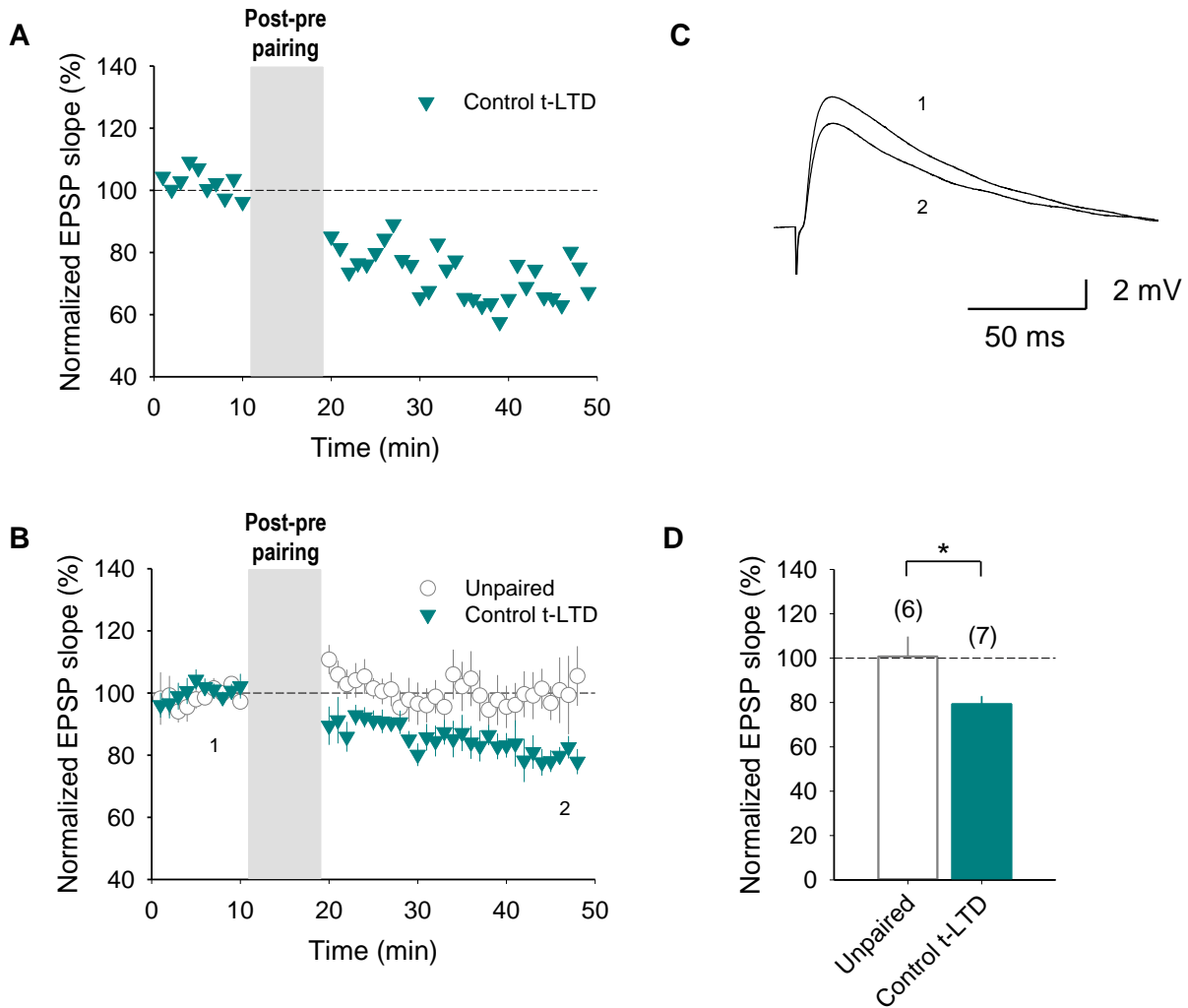
Una vez demostrado que se puede inducir t-LTP en la sinapsis estudiada, se determinó si era posible inducir LTD con un protocolo de STDP, alterando el orden temporal de la actividad sináptica. Para ello se aplicó un protocolo de apareamiento post-pre (EPSP precedido 12 ms de una la espiga postsináptica). La aplicación de dicho protocolo provocó una significativa t-LTD que alcanzó un valor de  $79 \pm 4\%$  ( $n = 7$ ) 30 minutos después de la aplicación del mismo, mientras que la ruta control permaneció inalterada ( $101 \pm 9\%$ ;  $n = 6$ ) (Fig. 18).

Estos resultados indican que se puede inducir tanto t-LTP como t-LTD en la sinapsis establecida entre las colaterales de Schaffer y las células piramidales de CA1 en el hipocampo de ratón, en animales con una edad comprendida entre P12-P18.

### 1.2 PERFIL DE DESARROLLO DE LA STDP EN LA SINAPSIS ESTABLECIDA ENTRE LAS COLATERALES DE SCHAFER (CA3) Y LAS CÉLULAS PIRAMIDALES DE CA1 EN EL HIPOCAMPO DE RATÓN.

Tras corroborar que es posible inducir tanto t-LTP como t-LTD en la sinapsis CS-CA1, se procedió a estudiar el perfil de desarrollo de ambas formas de plasticidad en dicha sinapsis. Conocer cuándo se inician en el desarrollo y si permanecen o no hasta la edad adulta puede ser clave para indicar en qué procesos fisiológicos están implicadas.

Para ello se estudiaron cuatro periodos diferentes del desarrollo temprano (P4-7; P8-P14; P15-P21; P22-P28), utilizando los protocolos anteriormente descritos.



**Figura 18. Inducción de t-LTD en la sinapsis CA3-CA1.** (A, B) El protocolo de pareamiento post-pre induce t-LTD. (A) Ejemplo del curso temporal de la ruta experimental en una única célula piramidal de CA1. (B) Curso temporal de la ruta experimental (triángulos azules) y de la ruta control (círculos blancos) de todas las células piramidales registradas. (C) Registros de EPSPs. Las trazas muestran un EPSP representativo antes (1) y 30 minutos después (2) de la aplicación del protocolo de pareamiento. (D) Cuantificación de los resultados. Sobre cada barra se indica entre paréntesis el número de células de cada experimento. Los resultados están expresados en valores medios  $\pm$  el error estándar de la media (EEM) (\* $p < 0.05$ ; test *t de Student*).

### 1.2.1 PERFIL DE DESARROLLO DE LA t-LTP.

La aplicación del protocolo de apareamiento pre-post provocó una robusta t-LTP en todas las neuronas registradas pertenecientes a ratones con una edad comprendida entre P8-P28, alcanzando un valor medio de  $159 \pm 11\%$  ( $n = 10$ ) en las células registradas en los periodos comprendidos entre P8-P21 y un valor de  $174 \pm 14\%$  ( $n = 8$ ) en las células registradas en el periodo P22-28. Estos resultados contrastan con la ausencia de t-LTP observada en el periodo comprendido entre P4-P7 ( $91 \pm 11\%$ ;  $n = 5$ ) tras la aplicación del protocolo de apareamiento pre-post (Fig. 19).

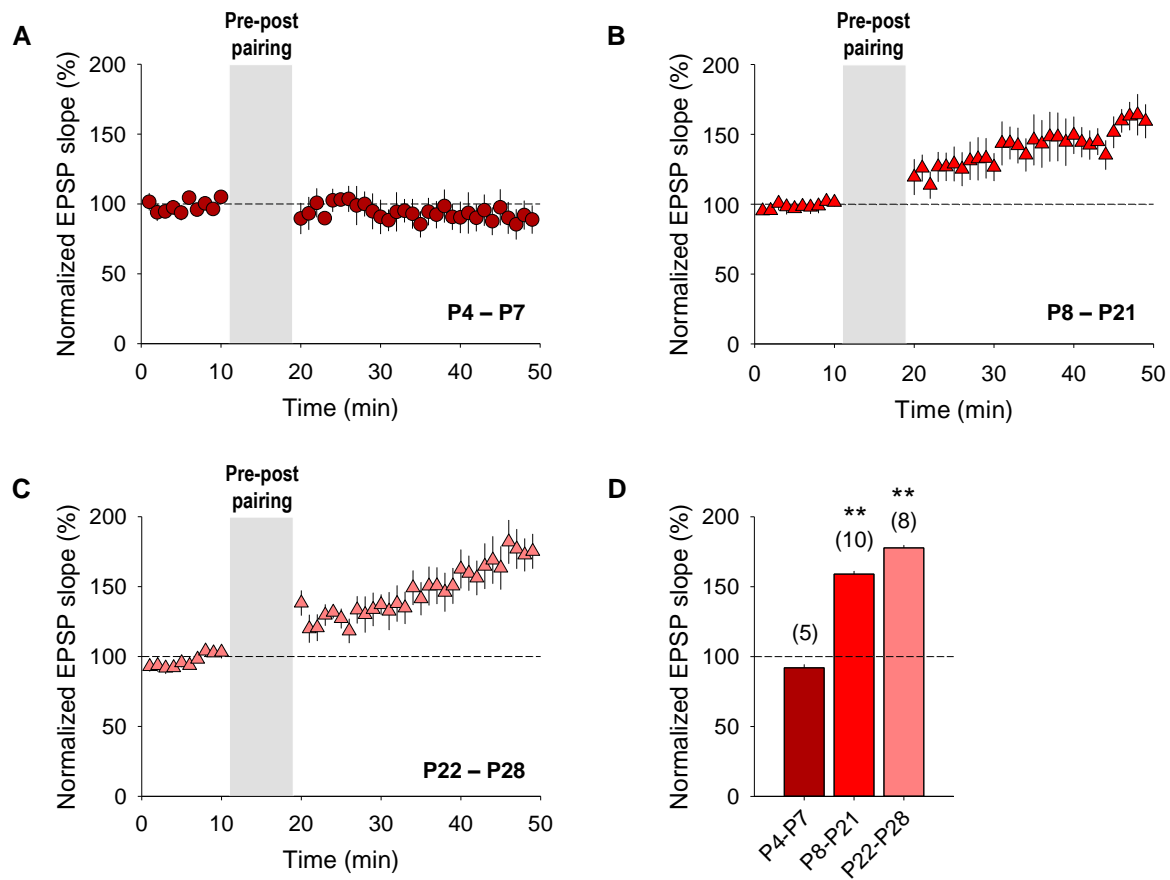
Estos resultados indican que la t-LTP emerge en la segunda semana postnatal y persiste en la edad adulta (P28) en la sinapsis establecida entre las colaterales de Schaffer y las neuronas piramidales en el hipocampo de ratón.

### 1.2.2 PERFIL DE DESARROLLO DE LA t-LTD.

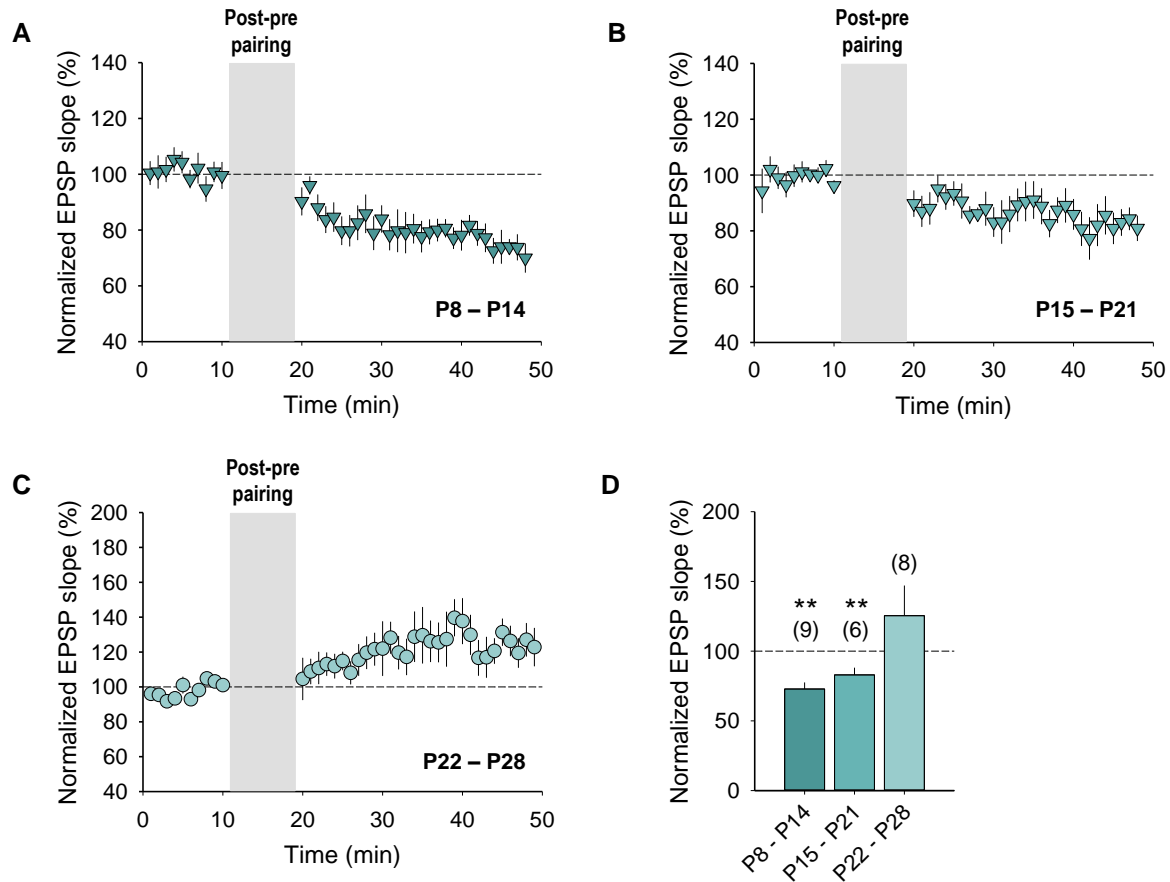
La aplicación del protocolo de apareamiento post-pre provocó t-LTD en las neuronas registradas pertenecientes a ratones con una edad comprendida entre P8-P14, alcanzando un valor de  $73 \pm 5\%$  ( $n = 9$ ), así como en las neuronas registradas pertenecientes a ratones con una edad comprendida entre P15-P21, alcanzando un valor de  $83 \pm 5\%$  ( $n = 6$ ) (Fig. 20). Este mismo protocolo fue incapaz de inducir t-LTD en esta sinapsis en el periodo comprendido entre P21-P28 ( $125 \pm 22\%$ ;  $n=8$ ) pudiéndose observar incluso cierta potenciación en muchas de las neuronas registradas (Fig. 20; Fig. 21). La aplicación del protocolo post-pre en neuronas registradas pertenecientes al periodo P4-P8 provocó tanto t-LTD como t-LTP (datos no mostrados).

Por tanto, la t-LTD inducida por un protocolo post-pre está presente durante el desarrollo temprano, en la primera semana postnatal (P4) y persiste hasta el final de la tercera semana postnatal, desapareciendo durante la cuarta semana de desarrollo.





**Figura 19. Perfil de desarrollo de la t-LTP en la sinapsis CA3-CA1 en el hipocampo de ratón.** Se monitorizó la eficacia sináptica antes, durante y tras la aplicación del protocolo de pareamiento pre-post en los periodos **(A)** P4-P7, **(B)** P8-P21 y **(C)** P22-P28. **(D)** Cuantificación de los resultados. Sobre cada barra se indica entre paréntesis el número de células de cada experimento. Los resultados están expresados en valores medios  $\pm$  el error estándar de la media (EEM) (\*\* $p < 0.01$ ; test *t* de Student).



**Figura 20. Perfil de desarrollo de la t-LTD en la sinapsis CA3-CA1 en el hipocampo de ratón.** Se monitorizó la eficacia sináptica antes, durante y tras la aplicación del protocolo de pareamiento post-pre en los periodos **(A)** P8-P14, **(B)** P15-P21 y **(C)** P22-P28. **(D)** Cuantificación de los resultados. Sobre cada barra se indica entre paréntesis el número de células de cada experimento. Los resultados están expresados en valores medios  $\pm$  el error estándar de la media (EEM) (\*\* $p < 0.01$ ; test *t* de Student).

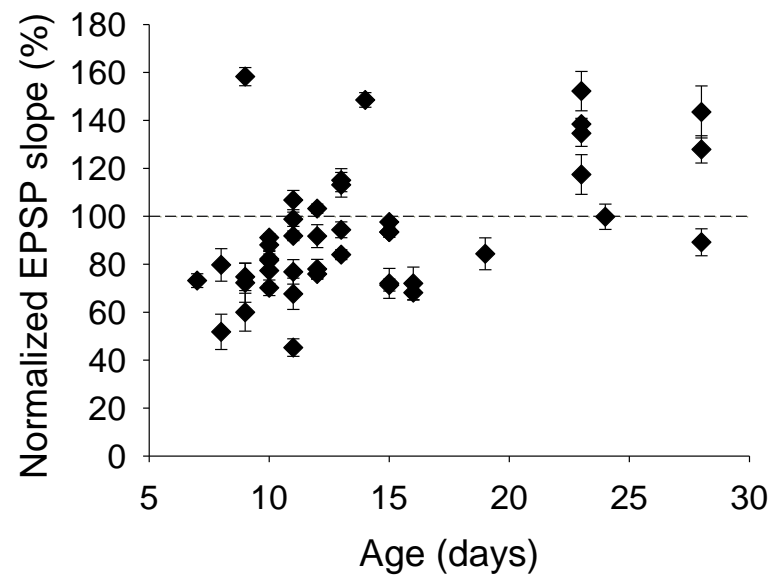


Figura 21. Cambio de t-LTD a t-LTP durante la cuarta semana de desarrollo tras la aplicación de un protocolo de apareamiento post-pre.

## IV. RESULTADOS

### Capítulo 2

#### 2. PAPEL DE LOS RECEPTORES DE TIPO NMDA EN LA STDP.....68

##### 2.1 DEPENDENCIA DE LA STDP DE RECEPTORES DE TIPO NMDA EN LA SINAPSIS ESTABLECIDA ENTRE LAS COLATERALES DE SCHAFFER Y LAS CÉLULAS PIRAMIDALES DE CA1 EN EL HIPOCAMPO DE RATÓN.....68

###### 2.1.1 LA INDUCCIÓN DE LA t-LTP ES DEPENDIENTE DE RECEPTORES DE TIPO NMDA .....69

###### 2.1.2 LA INDUCCIÓN DE LA t-LTD ES DEPENDIENTE DE RECEPTORES DE TIPO NMDA .....69

##### 2.2 LOCALIZACIÓN DE LOS RECEPTORES DE TIPO NMDA EN LA STDP .....72

###### 2.2.1 LA t-LTP REQUIERE DE LA ACTIVACIÓN DE RECEPTORES DE TIPO NMDA POSTSINÁPTICOS.....72

###### 2.2.2 LA t-LTD REQUIERE DE LA ACTIVACIÓN DE RECEPTORES DE TIPO NMDA NO POSTSINÁPTICOS .....72

###### 2.2.3 LA EXPRESIÓN DE LA t-LTD ES PRESINÁPTICA.....75

##### 2.3 DIFERENTE COMPOSICIÓN EN SUBUNIDADES DE LOS RECEPTORES DE TIPO NMDA NECESARIOS PARA LA INDUCCIÓN DE LA STDP .....77

###### 2.3.1 LA t-LTP PERO NO LA t-LTD ES DEPENDIENTE DE RECEPTORES DE TIPO NMDA QUE CONTIENEN LA SUBUNIDAD GLUN2A .....77

###### 2.3.2 LA t-LTP PERO NO LA t-LTD ES DEPENDIENTE DE RECEPTORES DE TIPO NMDA QUE CONTIENEN LA SUBUNIDAD GLUN2B.....79

2.3.3 LA t-LTD PERO NO LA t-LTP ES DEPENDIENTE DE RECEPTORES DE NMDA QUE CONTIENEN LA SUBUNIDAD GLUN2C/2D .....	83
---	----

## **2. PAPEL DE LOS RECEPTORES DE TIPO NMDA EN LA STDP.**

Los receptores de glutamato de tipo NMDA juegan un papel muy importante en las formas de plasticidad sináptica que mejor se conocen. Éstos actúan como un detector de coincidencia, correlacionando la actividad pre y postsináptica (Mayer et al., 1984, Nowak et al., 1984).

Se piensa que la activación de los receptores de tipo NMDA postsinápticos definen reglas de aprendizaje donde la coincidencia temporal de la actividad pre y postsináptica es un parámetro clave (Debanne et al., 1994, Nevian y Sakmann, 2006, Sjöström et al., 2003). En los pocos casos en los que se ha propuesto la participación de los receptores de tipo NMDA presinápticos, éstos han estado involucrados siempre en procesos de LTD (Sjöström et al., 2003; Rodríguez-Moreno y Paulsen, 2008).

La composición en subunidades de los receptores de tipo NMDA es variable, lo que da lugar a un gran número combinaciones diferentes, que otorgan al receptor diferentes propiedades biofísicas, farmacológicas y de señalización (Paoletti et al., 2013). Hay un gran interés en determinar si los diferentes subtipos de receptores de tipo NMDA llevan a cabo funciones diferentes.

Por todo ello uno de los objetivos más importantes del presente trabajo ha sido la caracterización de los receptores de tipo NMDA: determinar si están o no implicados en la inducción de la t-LTP y la t-LTD y, de ser así, conocer su localización y su composición en subunidades.

### **2.1 DEPENDENCIA DE LA STDP DE LOS RECEPTORES DE TIPO NMDA EN LA SINAPSIS ESTABLECIDA ENTRE LAS COLATERALES DE SCHAFER Y LAS CÉLULAS PIRAMIDALES DE CA1 EN EL HIPOCAMPO DE RATÓN.**

Para determinar si los receptores de tipo NMDA son una fuente relevante de calcio en la STDP, como ha sido propuesto para algunas formas STDP (Froemke et al., 2005; Karmarkar y

Buonomanno, 2002; Koester y Sakmann, 1998; Shouval et al., 2002), se estudió su papel en la inducción de la t-LTP y la t-LTD utilizando el antagonista general de los receptores de tipo NMDA D-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (D-AP5).

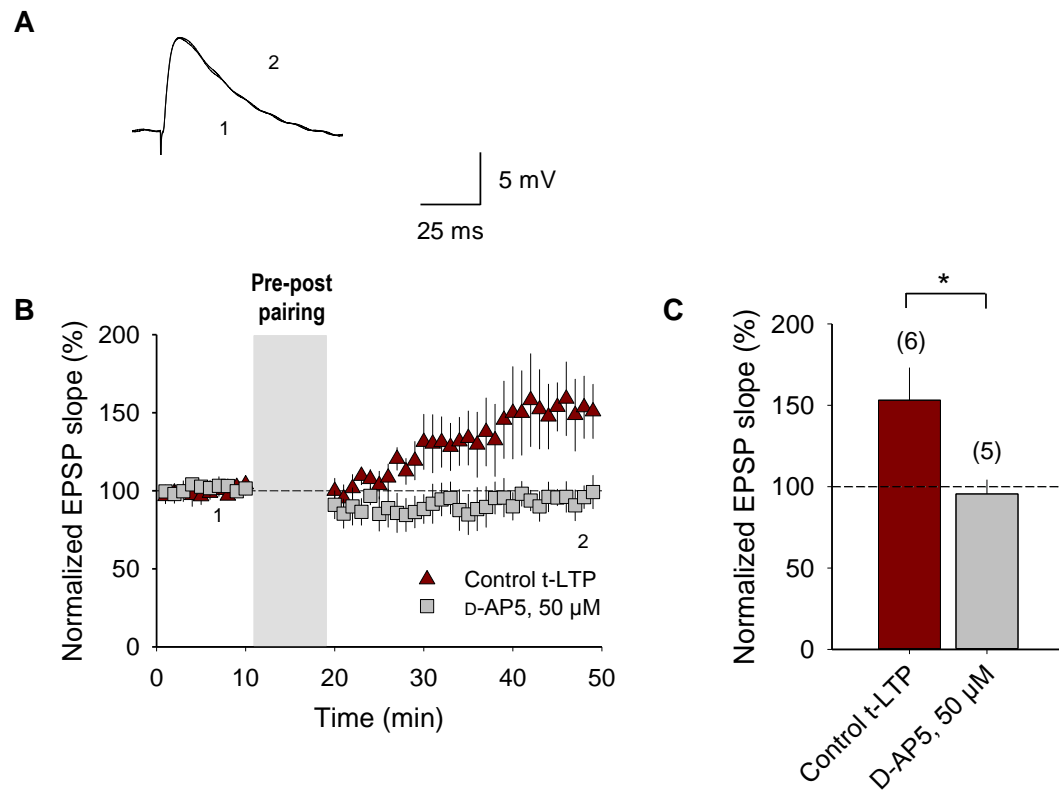
#### 2.1.1 LA INDUCCIÓN DE LA t-LTP ES DEPENDIENTE DE RECEPTORES DE TIPO NMDA.

La aplicación de D-AP5 (50  $\mu$ M), comenzando 10 minutos antes de la aplicación del protocolo de pareamiento pre-post, bloqueó la inducción de la t-LTP ( $95 \pm 9\%$ ,  $n = 6$ ; en comparación con la t-LTP observada en controles intercalados no tratados,  $153 \pm 20\%$ ,  $n = 5$ ; Fig. 22).

#### 2.1.2 LA INDUCCIÓN DE LA t-LTD ES DEPENDIENTE DE RECEPTORES DE TIPO NMDA.

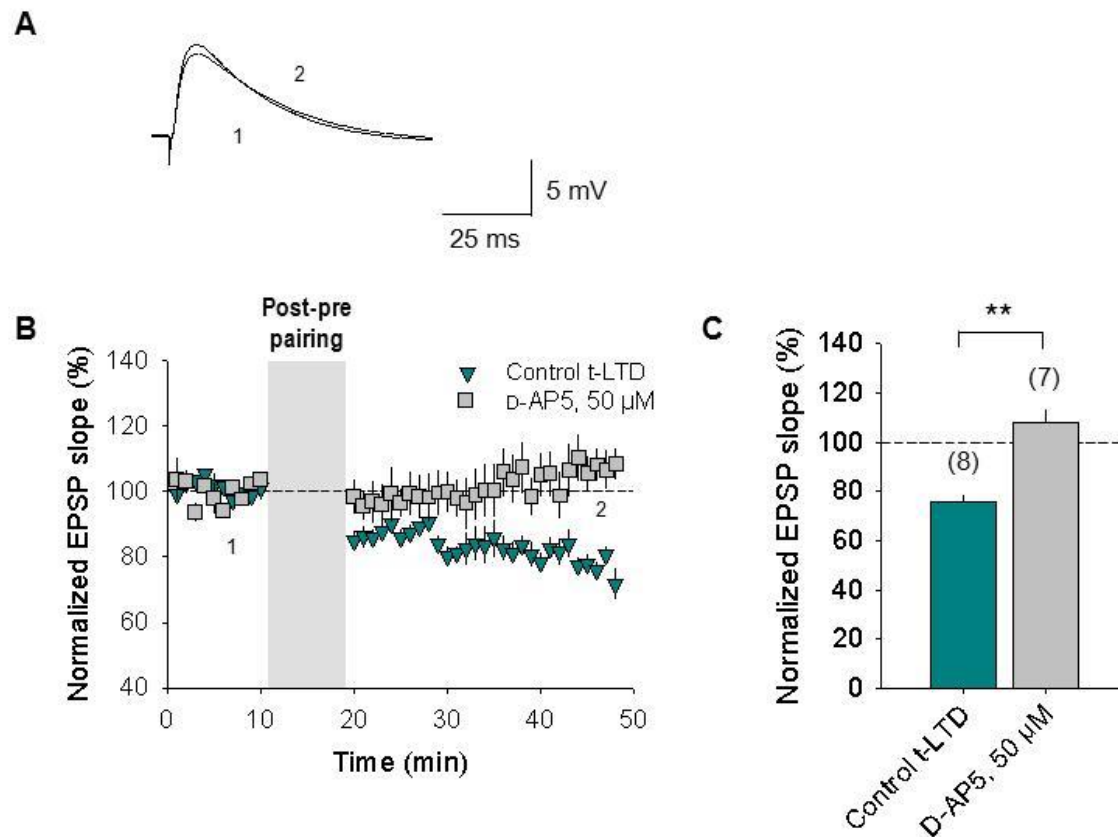
Asimismo, en las rodajas tratadas con D-AP5 (50  $\mu$ M), la aplicación de un protocolo de pareamiento post-pre fue incapaz de inducir t-LTD ( $108 \pm 6\%$ ,  $n = 7$ ; en comparación con la t-LTD observada en controles intercalados no tratados,  $76 \pm 3\%$ ,  $n = 8$ ; Fig. 23).

Estos resultados indican que los receptores de tipo NMDA son necesarios para la inducción tanto de la t-LTP como de la t-LTD en la sinapsis CS-CA1 en el hipocampo de ratón.



**Figura 22. La t-LTP requiere de receptores de tipo NMDA.** La inducción de la t-LTP se previno completamente en presencia de D-AP5, 50  $\mu$ M. **(A)** Registros de EPSPs. Las trazas muestran un EPSP representativo antes (1) y 30 minutos después (2) de la aplicación del protocolo de pareamiento pre-post en presencia de D-AP5. **(B)** Curso temporal de las células tratadas con D-AP5 (cuadrados grises) y de las células sin tratar (triángulos burdeos). **(C)** Cuantificación de los resultados. Sobre cada barra se indica entre paréntesis el número de células de cada experimento. Los resultados están expresados en valores medios  $\pm$  el error estándar de la media (EEM) (\* $p < 0.05$ ; test *t* de Student).





**Figura 23. La t-LTD requiere de receptores de tipo NMDA.** La inducción de la t-LTD se previno completamente en presencia de D-AP5, 50  $\mu$ M. **(A)** Registros de EPSPs. Las trazas muestran un EPSP representativo antes (1) y 30 minutos después (2) de la aplicación del protocolo de pareamiento post-pre en presencia de D-AP5. **(B)** Curso temporal de las células tratadas con D-AP5 (cuadrados grises) y de las células sin tratar (triángulos azules). **(C)** Cuantificación de los resultados. Sobre cada barra se indica entre paréntesis el número de células de cada experimento. Los resultados están expresados en valores medios  $\pm$  el error estándar de la media (EEM) (\*\*p < 0.01; test *t* de Student).

## 2.2 LOCALIZACIÓN DE LOS RECEPTORES DE TIPO NMDA EN LA STDP.

Tras demostrar que los receptores de tipo NMDA están involucrados en la STDP en la sinapsis estudiada, se quiso investigar la localización pre o postsináptica de los mismos, tanto para la inducción de la t-LTP y como de la t-LTD.

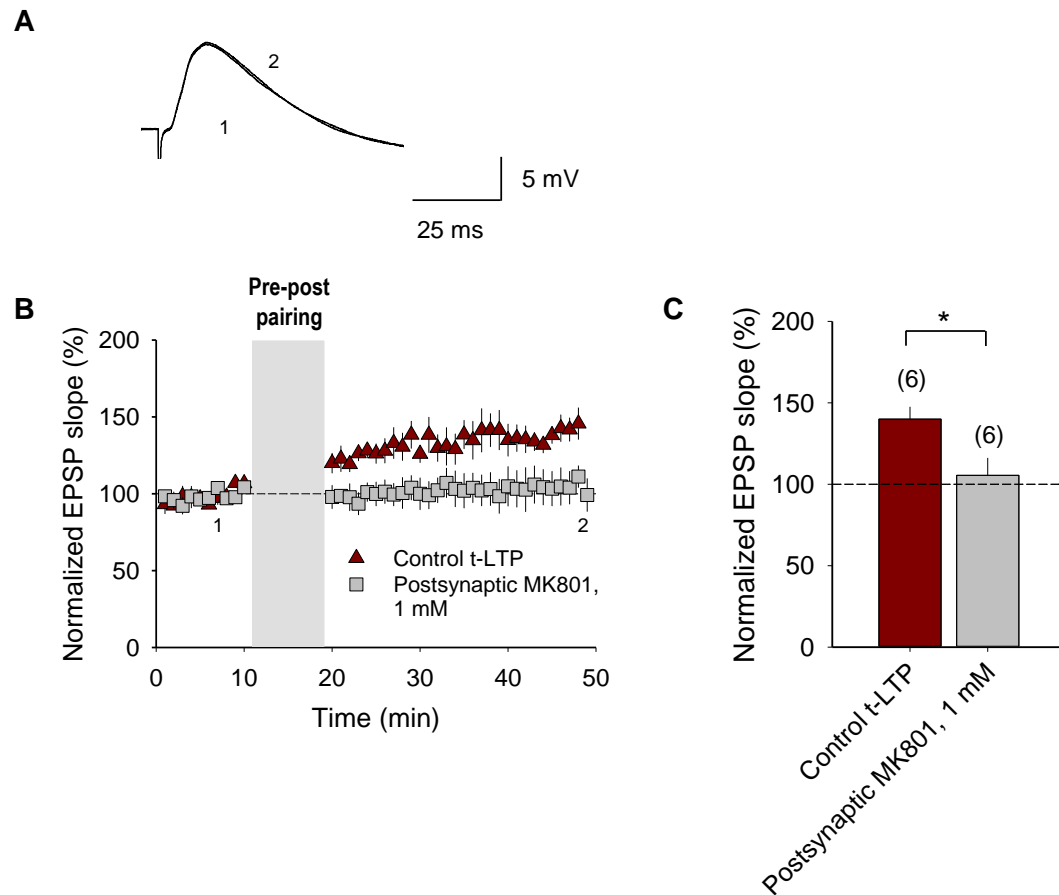
Para ello se repitieron los experimentos introduciendo en la neurona postsináptica, utilizando la pipeta de registro, el bloqueador de receptores de tipo NMDA dependiente de actividad MK801.

### 2.2.1 LA t-LTP REQUIERE DE LA ACTIVACIÓN DE RECEPTORES DE TIPO NMDA POSTSINÁPTICOS.

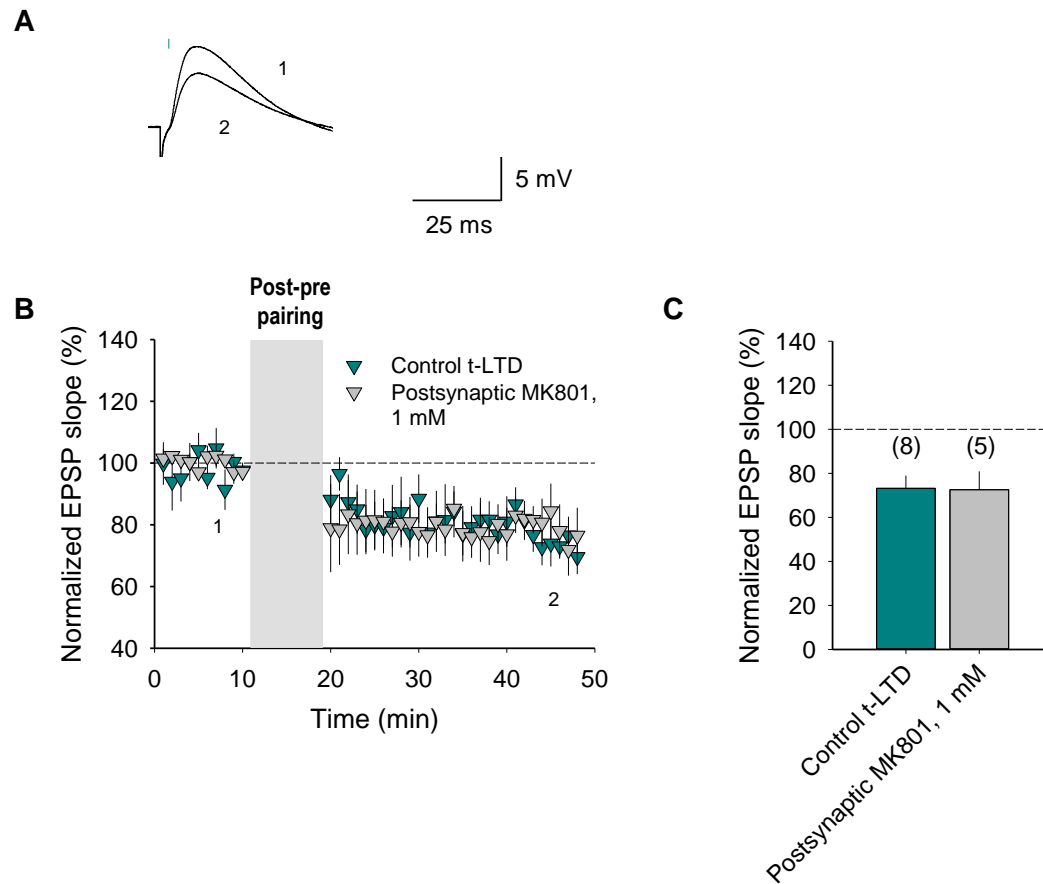
El antagonismo de los de los receptores de tipo NMDA postsinápticos mediante la inclusión de MK801 (1 mM) en la pipeta de registro, previno la inducción de la t-LTP tras la aplicación de un protocolo de pareamiento pre-post ( $105 \pm 6\%$ ,  $n = 6$ ; en comparación con la t-LTP observada en controles intercalados,  $140 \pm 8\%$ ,  $n = 6$ ; Fig. 24).

### 2.2.2 LA t-LTD REQUIERE DE RECEPTORES DE TIPO NMDA NO POSTSINÁPTICOS.

En contraste con el resultado anterior, el antagonismo de los receptores de tipo NMDA postsinápticos mediante la inclusión de MK801 (1 mM) en la pipeta de registro fue incapaz de prevenir la inducción de t-LTD tras la aplicación de un protocolo de pareamiento post-pre ( $73 \pm 6\%$ ,  $n = 8$ ; en comparación con la t-LTD observada en controles intercalados no tratados,  $73 \pm 8\%$ ,  $n = 5$ ; Fig. 25). Para descartar que la falta de efecto se debiera a una concentración de MK801 insuficiente, se repitió el experimento incluyendo MK801 (4 mM) en la pipeta de registro. Para esta concentración el resultado obtenido fue el mismo que para 1 mM: en presencia de MK801 (4 mM) no se previno la inducción de t-LTD ( $76 \pm 6\%$ ,  $n = 5$ , controles intercalados no tratados,  $71 \pm 7\%$ ,  $n = 5$ ).



**Figura 24. La t-LTP requiere de receptores de tipo NMDA postsinápticos.** La inducción de la t-LTP se previno completamente al cargar con MK801 (1 mM) la neurona postsináptica. **(A)** Registros de EPSPs. Las trazas muestran un EPSP representativo antes (1) y 30 minutos después (2) de la aplicación del protocolo de pareamiento pre-post. **(B)** Curso temporal de las células tratadas con MK 801 (cuadrados grises) y de las células sin tratar (triángulos burdeos). **(C)** Cuantificación de los resultados. Sobre cada barra se indica entre paréntesis el número de células de cada experimento. Los resultados están expresados en valores medios  $\pm$  el error estándar de la media (EEM) (\*p < 0.05; test t de Student).



**Figura 25. La t-LTP no requiere de receptores de tipo NMDA postsinápticos.** La inducción de la t-LTP no se vio afectada al cargar con MK801 (1 mM) la neurona postsináptica. **(A)** Registros de EPSPs. Las trazas muestran un EPSP representativo antes (1) y 30 minutos después (2) de la aplicación del protocolo de pareamiento post-pre. **(B)** Curso temporal de las células tratadas con MK 801 (triángulos grises) y células sin tratar (triángulos azules). **(C)** Cuantificación de los resultados. Sobre cada barra se indica entre paréntesis el número de células de cada experimento. Los resultados están expresados en valores medios  $\pm$  el error estándar de la media (EEM).

Estos resultados indican que mientras que la inducción de t-LTP requiere de receptores de tipo NMDA postsinápticos, la t-LTD no requiere de receptores de tipo NMDA situados en la célula postsináptica.

### 2.2.3 LA EXPRESIÓN DE LA t-LTD ES PRESINÁPTICA.

Dado que la t-LTD fue prevenida en presencia de D-AP5 (50  $\mu$ M) pero no tras la inclusión de MK801 (1 mM y 4 mM) en la neurona postsináptica, los receptores de tipo NMDA necesarios para la inducción de la t-LTD podrían tener una localización presináptica, tal como se ha descrito en algunas sinapsis neocorticales (Bender et al., 2006; Nevian y Sakmann, 2006; Rodríguez-Moreno y Paulsen, 2008; Corlew et al., 2007; Corlew et al., 2008; Rodríguez-Moreno et al., 2011; Rodríguez-Moreno et al., 2013).

Para determinar el lugar de expresión de la t-LTD en la sinapsis estudiada se realizaron distintos análisis:

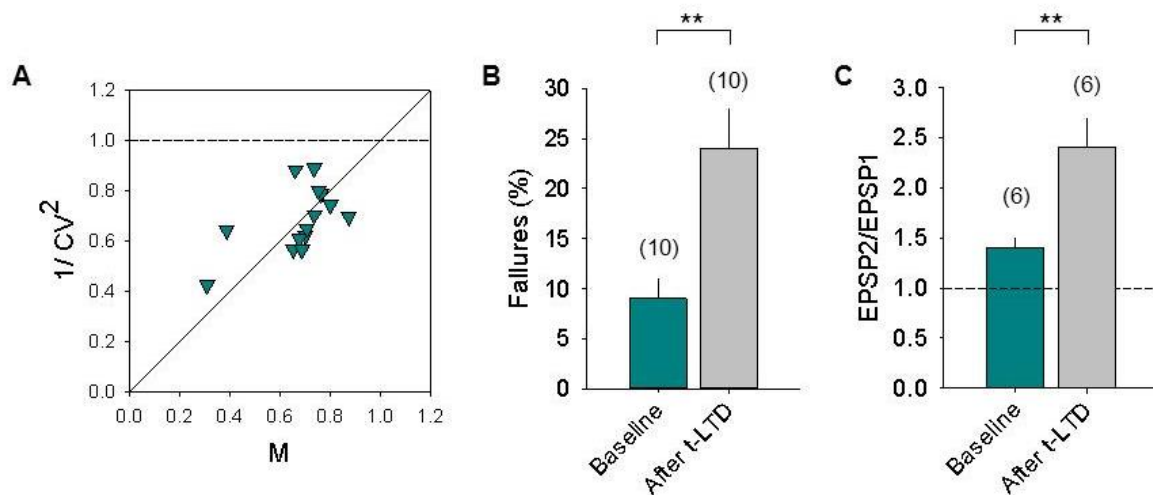
En primer lugar, se analizó la fluctuación de la amplitud de las respuestas postsinápticas, para ello se calculó el Coeficiente de variación libre de ruido (CV) de las respuestas sinápticas antes y después de la inducción de la t-LTD. Al representar  $1/CV^2$  frente a la pendiente media de los EPSP (M) antes y después de la inducción de la t-LTD, los puntos se situaron preferentemente sobre una línea diagonal (Fig. 26.A). Un cambio en la M asociado a un cambio en el  $1/CV^2$  es indicativo de un mecanismo de acción presináptico.

En segundo lugar, dado que en varios experimentos se observaron fallos en la transmisión sináptica, se analizó un posible cambio en el número de fallos después de la inducción de la t-LTD. Tras dicho análisis, se observó un incremento consistente en el número de fallos después de la inducción de la t-LTD ( $24 \pm 4\%$ ,  $n = 10$  tras la inducción de la t-LTD en comparación con un  $9 \pm 2\%$  en la línea base,  $n = 10$ ; Fig 26.B). Este resultado sugiere un *locus* de expresión presináptico para la t-LTD.

Finalmente, se analizó el cambio en el ratio de las respuestas por pares de pulsos (PPR) durante la línea base y 30 minutos después de la aplicación de protocolo de pareamiento post-

pre. El análisis del PPR antes y después de la inducción de la t-LTD mostró un incremento significativo en el PPR después de la t-LTD ( $2.4 \pm 0.3$ ,  $n = 6$  en comparación con un  $1.4 \pm 0.1$  en la línea base,  $n = 6$ ;  $p < 0.01$ ; empleando el test *t de student*. Fig 26.C), lo cual es también indicativo de un mecanismo de acción presináptico (disminución en la probabilidad de liberación).

Todas las distintas aproximaciones realizadas son indicativas de un locus de expresión presináptico para esta forma de t-LTD.



**Figura 26. La t-LTD muestra una expresión presináptica. (A)** El análisis del CV es consistente con un mecanismo de acción presináptico para la t-LTD. La representación normalizada del estadístico  $CV^{-2}$  versus la pendiente media de los EPSPs se sitúa preferentemente sobre la diagonal. **(B)** El número de fallos aumenta tras la inducción de la t-LTD. **(C)** El PPR aumenta tras la inducción de la t-LTD. Sobre cada barra se indica entre paréntesis el número de células de cada experimento. Los resultados están expresados en valores medios  $\pm$  el error estándar de la media (EEM) (\*\* $p < 0.01$ ; test *t de Student*).

### 2.3 DIFERENTE COMPOSICIÓN EN SUBUNIDADES DE LOS RECEPTORES DE TIPO NMDA NECESARIOS PARA LA INDUCCIÓN DE LA STDP.

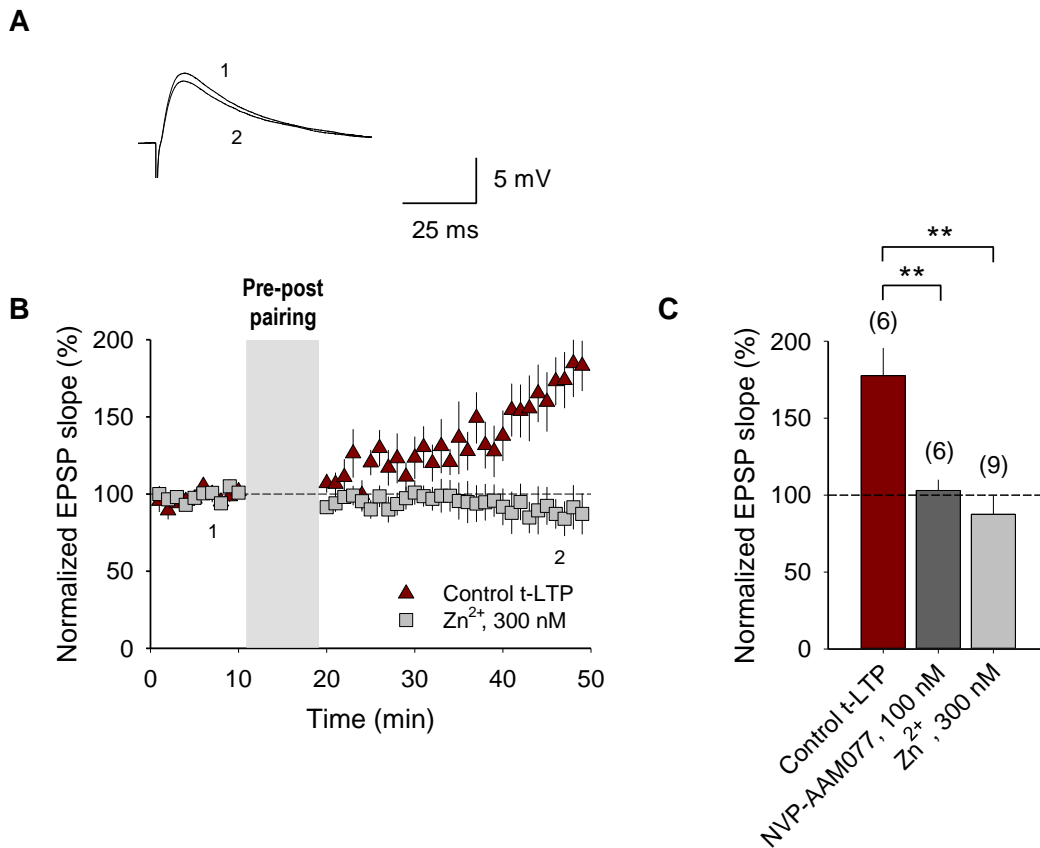
Después de demostrar que tanto la t-LTP como la t-LTD requieren de receptores de tipo NMDA para su inducción, aunque con diferente localización, se quiso determinar la composición en subunidades de los receptores involucrados en ambas formas de plasticidad.

Para ello se repitieron los experimentos en presencia de una batería de antagonistas de los receptores de tipo NMDA que contienen subunidades concretas.

#### 2.3.1 LA t-LTP PERO NO LA t-LTD ES DEPENDIENTE DE RECEPTORES DE TIPO NMDA QUE CONTIENEN LA SUBUNIDAD GLUN2A.

Para determinar si los receptores de tipo NMDA que contienen la subunidad GluN2A son necesarios para la inducción de la t-LTP y la t-LTD, se utilizó el antagonista NVP-AAM077, que tiene mayor afinidad por receptores de tipo NMDA que contienen dicha subunidad (Auberson et al., 2002). La inducción de la t-LTP, tras la aplicación de un protocolo de pareamiento pre-post, se previno completamente en las células tratadas con NVP-AAM077 (100 nM) ( $103 \pm 7\%$ ,  $n = 6$ ; en comparación con la t-LTP observada en controles intercalados no tratados,  $177 \pm 18\%$ ,  $n = 6$ ; Fig. 27C; Fig. 33).

Para corroborar este resultado, se utilizó también un inhibidor alostérico de los receptores de tipo NMDA que contienen la subunidad GluN2A, el Zinc ( $Zn^{2+}$ ) (Neyton y Paoletti., 2006). La inducción de la t-LTP también se previno completamente en las células tratadas con  $Zn^{2+}$  (300nM) ( $88 \pm 12\%$ ,  $n = 9$ ; en comparación con la t-LTP observada en controles intercalados no tratados,  $177 \pm 18\%$ ,  $n = 6$ ; Fig. 27; Fig. 33).



**Figura 27. La t-LTP requiere de receptores de tipo NMDA que contienen la subunidad GluN2A.** La inducción de la t-LTP se bloqueó completamente en presencia de  $Zn^{2+}$  (300nM) y en presencia de NVP-AAM077 (100 nM). **(A)** Registros de EPSPs. Las trazas muestran un EPSP representativo antes (1) y 30 minutos después (2) de la aplicación del protocolo de pareamiento pre-post en rodajas tratadas con  $Zn^{2+}$  **(B)** Curso temporal de las células tratadas con  $Zn^{2+}$  (cuadrados grises) y de las células sin tratar (triángulos burdeos). **(C)** Cuantificación de los resultados. Sobre cada barra se indica entre paréntesis el número de células de cada experimento. Los resultados están expresados en valores medios  $\pm$  el error estándar de la media (EEM) (\*\*p < 0.01; test *t* de Student).



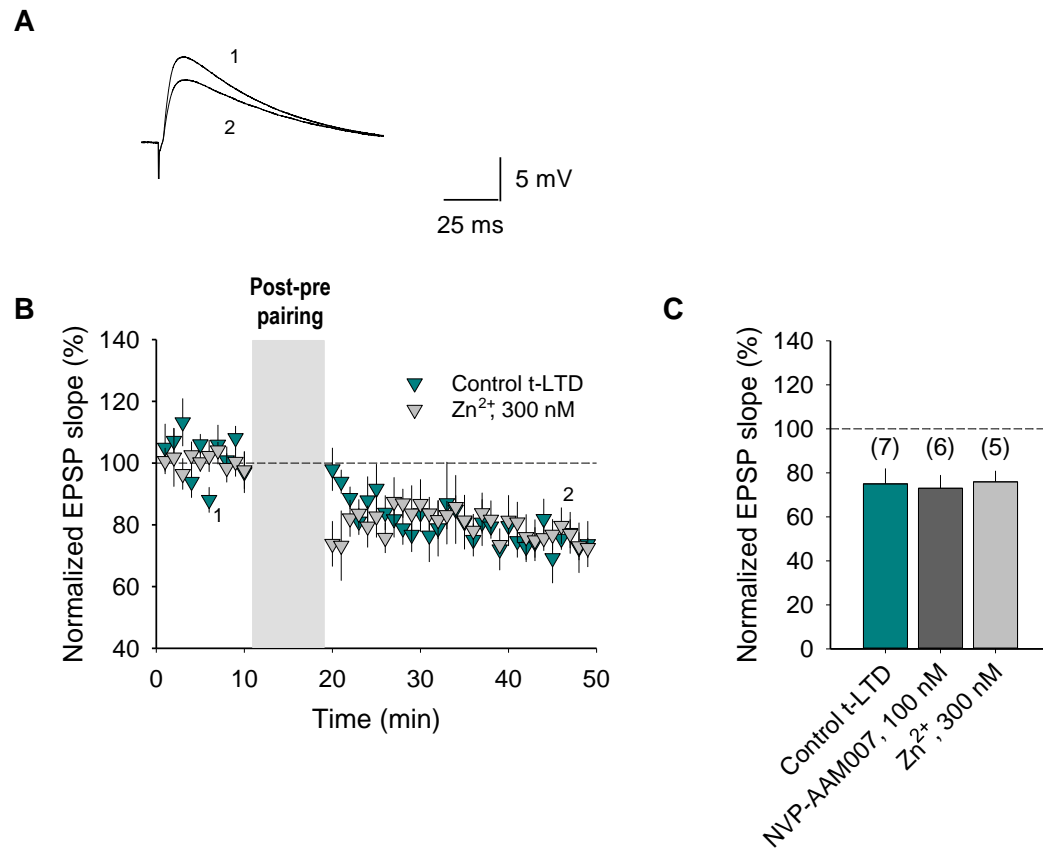
Contrariamente a los resultados observados para la t-LTP, tanto la aplicación de NVP-AAM077 (100 nM) como de  $Zn^{2+}$  (300 nM) no afectaron a la t-LTD inducida mediante un protocolo de pareamiento post-pre (células tratadas con NVP-AAM077 (100 nM),  $75 \pm 7\%$ ,  $n = 7$ ; células tratadas con  $Zn^{2+}$  (300 nM),  $73 \pm 6\%$ ,  $n = 6$ ; en comparación con la t-LTD observada en controles intercalados no tratados,  $75 \pm 5\%$ ,  $n = 5$ ; Fig. 28; Fig. 33).

Estos resultados indican que los receptores de tipo NMDA que contienen la subunidad GluN2A son necesarios para la inducción de la t-LTP, pero no para la inducción de la t-LTD en la sinapsis CS-CA1 en el hipocampo de ratón.

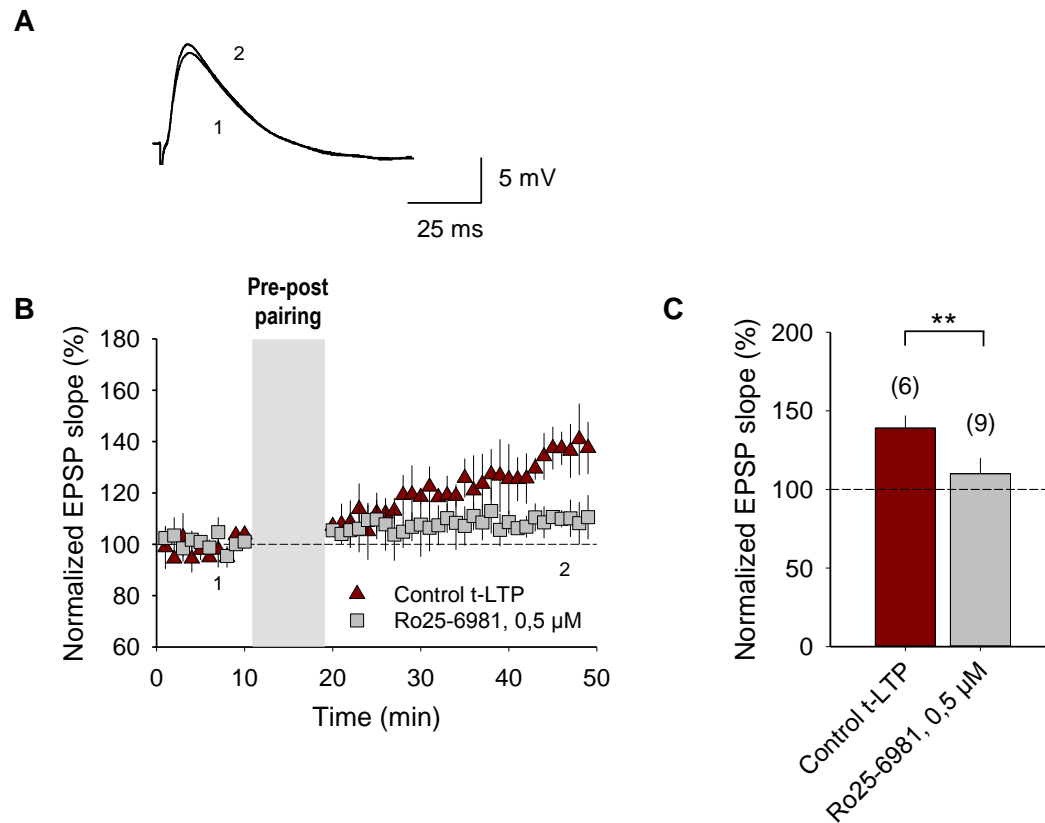
### 2.3.2 LA t-LTP PERO NO LA t-LTD ES DEPENDIENTE DE RECEPTORES DE TIPO NMDA QUE CONTIENEN LA SUBUNIDAD GLUN2B.

Seguidamente se determinó si los receptores de tipo NMDA que contienen la subunidad GluN2B son necesarios para la inducción de t-LTP y t-LTD. Para ello se utilizó el antagonista no competitivo de receptores de tipo NMDA que contienen la subunidad GluN2B Ro25-6981, (Fisher et al.,1997). La t-LTP, inducida mediante un protocolo de pareamiento pre-post, se bloqueó casi completamente en las células tratadas con Ro25-6981 (0.5  $\mu$ M) ( $110 \pm 10\%$ ,  $n = 6$ ; en comparación con la t-LTP observada en controles intercalados,  $139 \pm 8\%$ ,  $n = 9$ ; Fig. 29; Fig. 33). Sin embargo, la t-LTD, inducida mediante un protocolo de pareamiento post-pre, no se previno ( $80 \pm 7\%$ ,  $n = 11$ ; en comparación con la t-LTD observada en controles intercalados no tratados,  $75 \pm 8\%$ ,  $n = 6$ ; Fig. 30; Fig. 33).

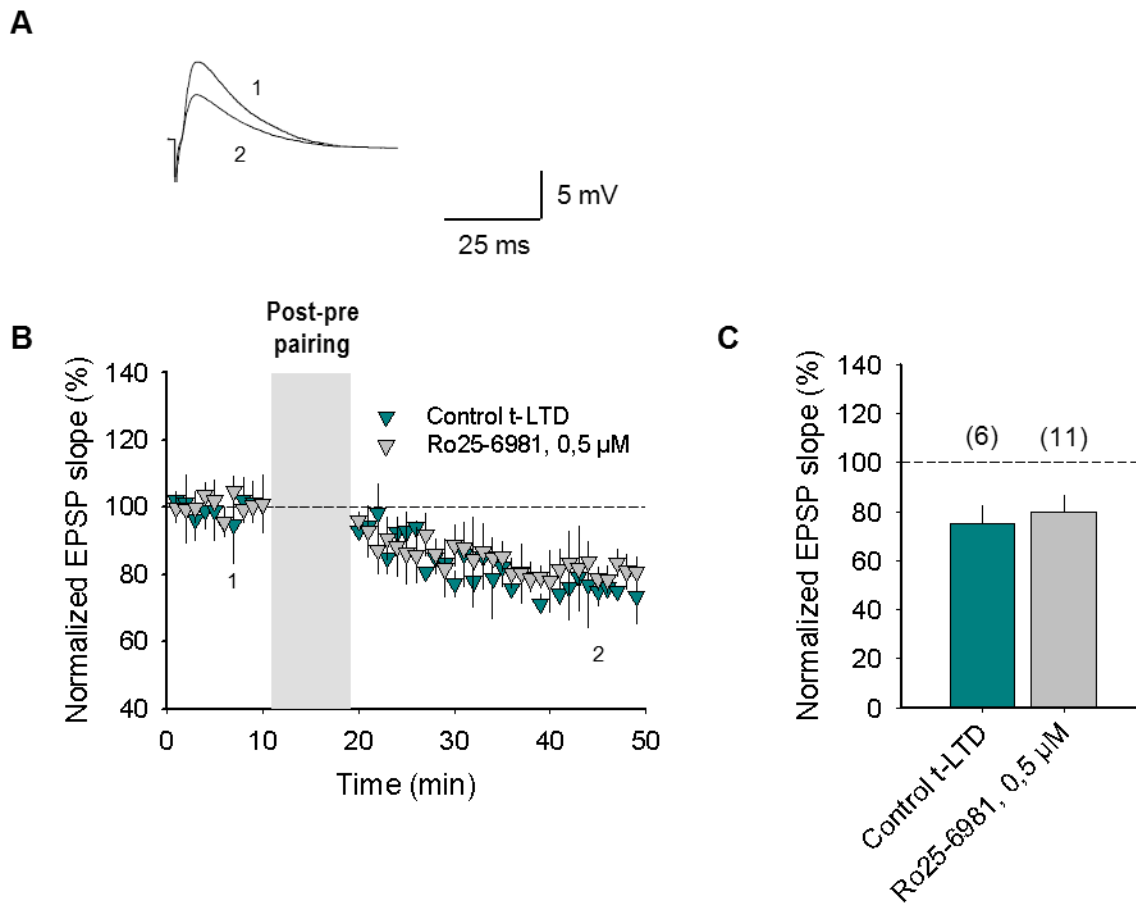
Estos resultados indican que la inducción de la t-LTP requiere de receptores de tipo NMDA que contienen la subunidad GluN2B, no siendo necesarios para la inducción de la t-LTD en la sinapsis CS-CA1 en el hipocampo de ratón.



**Figura 28. La t-LTD no requiere de receptores de tipo NMDA que contienen la subunidad GluN2A.** La inducción de la t-LTD no se vio afectada en presencia de Zn<sup>2+</sup> (300 nM) ni en presencia de NVP-AAM077 (100 nM). **(A)** Registros de EPSPs. Las trazas muestran un EPSP representativo antes (1) y 30 minutos después (2) de la aplicación del protocolo de pareamiento post-pre en presencia de Zn<sup>2+</sup>. **(B)** Curso temporal de las células tratadas con Zn<sup>2+</sup> (triángulos grises) y de las células sin tratar (triángulos azules). **(C)** Cuantificación de los resultados. Sobre cada barra se indica entre paréntesis el número de células de cada experimento. Los resultados están expresados en valores medios  $\pm$  el error estándar de la media (EEM).



**Figura 29. La t-LTP requiere de receptores de tipo NMDA que contienen la subunidad GluN2B.** La inducción de la t-LTP se bloqueó completamente en presencia de Ro25-6981 (0.5  $\mu$ M). **(A)** Registros de EPSPs. Las trazas muestran un EPSP representativo antes (1) y 30 minutos después (2) de la aplicación del protocolo de pareado pre-post en presencia de Ro25-6981. **(B)** Curso temporal de las células tratadas con Ro25-6981 (cuadrados grises) y de las células sin tratar (triángulos burdeos). **(C)** Cuantificación de los resultados. Sobre cada barra se indica entre paréntesis el número de células de cada experimento. Los resultados están expresados en valores medios  $\pm$  el error estándar de la media (EEM) (\*\* $p < 0.01$ ; test *t de Student*).



**Figura 30. La t-LTD no requiere de receptores de tipo NMDA que contienen la subunidad GluN2B.** La inducción de la t-LTD no se vio afectada en presencia de Ro 25-6981 (0.5  $\mu$ M). **(A)** Registros de EPSPs. Las trazas muestran un EPSP representativo antes (1) y 30 minutos después (2) de la aplicación del protocolo de pareamiento post-pre en presencia de Ro25-6981. **(B)** Curso temporal de las células tratadas con Ro25-6981 (cuadrados grises) y de las células sin tratar (triángulos azules). **(C)** Cuantificación de los resultados. Sobre cada barra se indica entre paréntesis el número de células de cada experimento. Los resultados están expresados en valores medios  $\pm$  el error estándar de la media (EEM).

### 2.3.3 LA t-LTD PERO NO LA t-LTP ES DEPENDIENTE DE RECEPTORES DE TIPO NMDA QUE CONTIENEN LA SUBUNIDAD GLUN2C/2D.

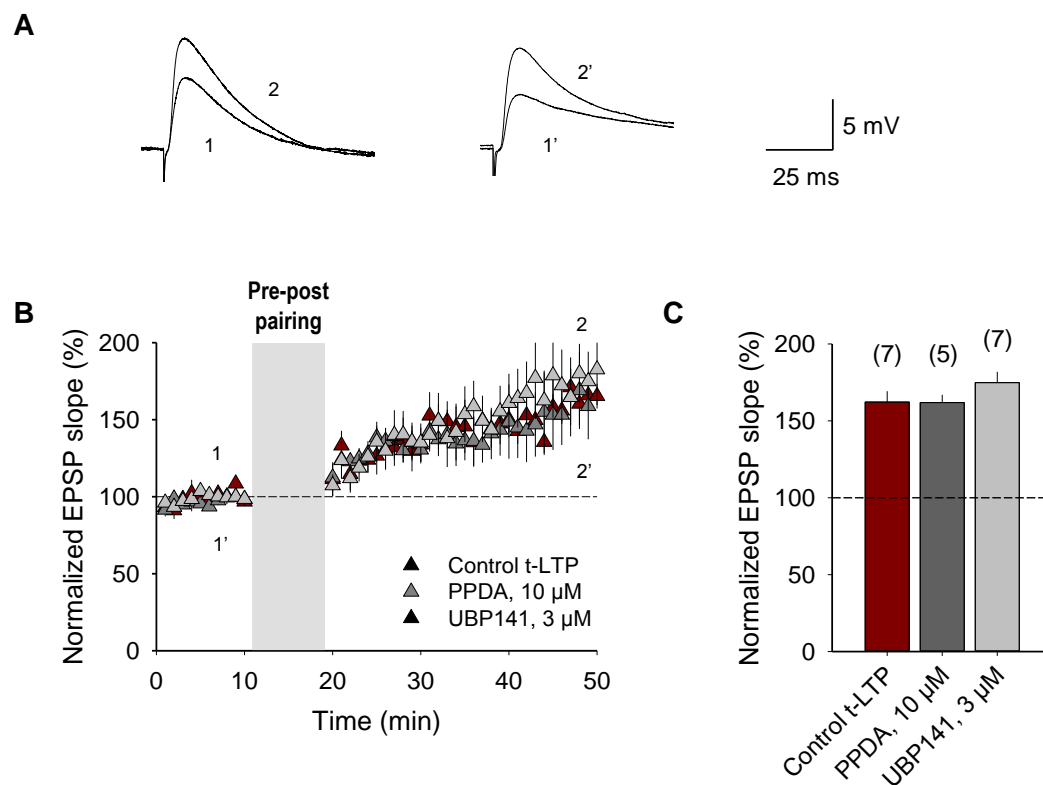
Por último, dado que la t-LTD depende de receptores de tipo NMDA pero es independiente de aquellos receptores que contienen las subunidades GluN2A y GluN2B, se determinó si los receptores de tipo NMDA que contienen la subunidad GluN2C/2D son necesarios para la inducción de la t-LTP y la t-LTD (Monyer et al., 1994).

Para ello se utilizó un antagonista competitivo, pero moderadamente selectivo para receptores de tipo NMDA que contienen dicha subunidad, PPDA (Morley, 2005). La inducción de la t-LTP, tras la aplicación de un protocolo de pareamiento pre-post, no se vio afectada en células tratadas con PPDA (10  $\mu$ M) ( $162 \pm 23\%$ ,  $n = 5$ ; en comparación con la t-LTP observada en controles intercalados no tratados,  $162 \pm 11\%$ ,  $n = 7$ ; Fig. 31; Fig. 33).

Para corroborar este resultado, se utilizó también un antagonista menos potente pero más selectivo, UBP141 (Morley, 2005). La inducción de la t-LTP no se bloqueó en células tratadas con UBP141 (3  $\mu$ M) ( $174 \pm 21\%$ ,  $n = 7$ ; en comparación con la t-LTP observada en controles intercalados no tratados,  $162 \pm 11\%$ ,  $n = 7$ ; Fig. 31; Fig. 33).

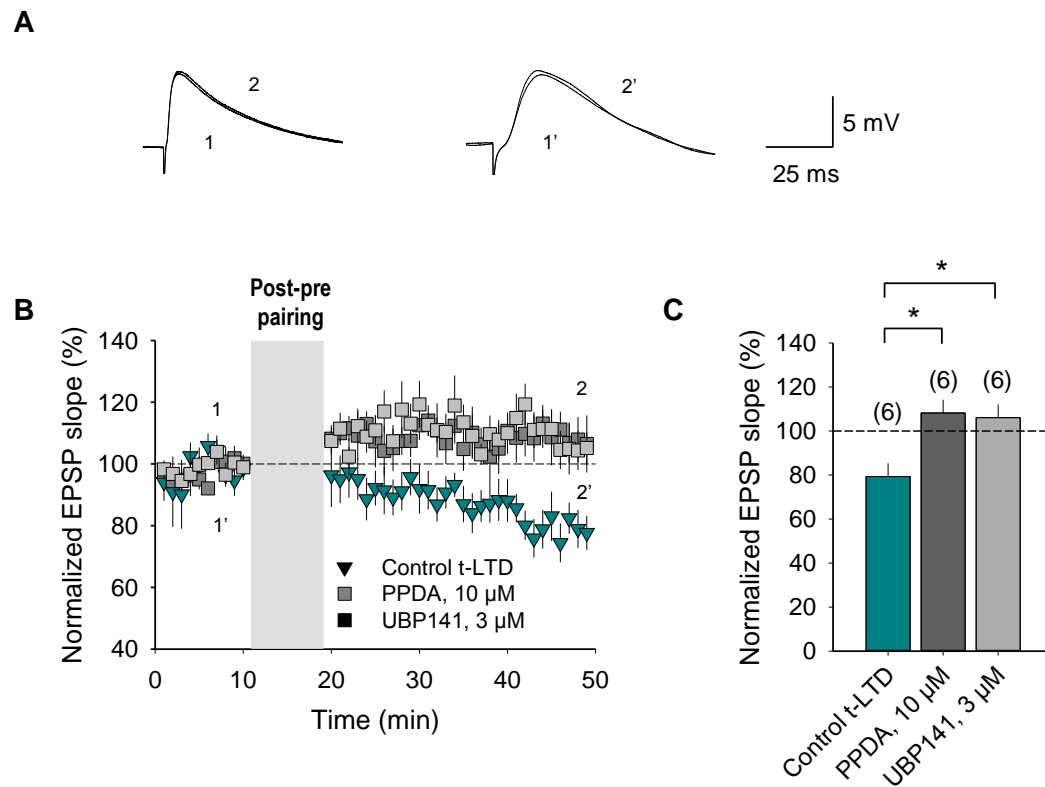
La t-LTD, inducida mediante un protocolo de pareamiento post-pre, se bloqueó tanto en las células tratadas con PPDA como en las células tratadas con UBP141 (células tratadas con PPDA (10  $\mu$ M)  $108 \pm 8\%$ ,  $n = 6$ ; células tratadas con UBP141 (3  $\mu$ M),  $107 \pm 6\%$ ,  $n = 6$ ; en comparación con la t-LTD observada en controles intercalados no tratados,  $79 \pm 6\%$ ,  $n = 6$ ; Fig. 32; Fig. 33).

Estos resultados indican que los receptores de tipo NMDA necesarios para la inducción de la t-LTD contienen la subunidad GluN2C/2D y los receptores de tipo NMDA necesarios para la inducción de la t-LTP contienen las subunidades GluN2A y GluN2B.

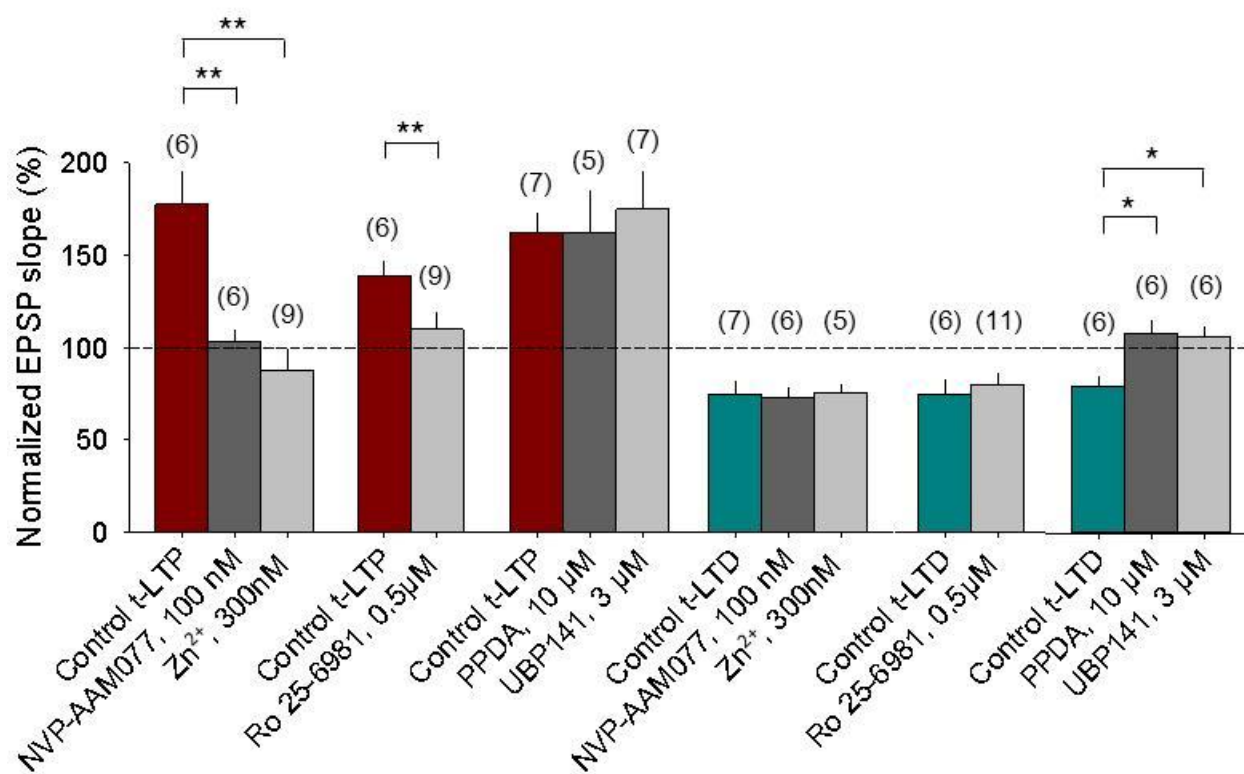


**Figura 31. La t-LTP no requiere de receptores de tipo NMDA que contienen la subunidad GluN2C/2D.**

La inducción de la t-LTP no se vio afectada en presencia de PPDA (10  $\mu$ M) ni en presencia de UBP141 (3  $\mu$ M). **(A)** Registros de EPSPs. Las trazas muestran un EPSP representativo antes (1) y 30 minutos después (2) de la aplicación del protocolo de pareamiento pre-post en presencia de UBP141, así como en presencia de PPDA (1' y 2'). **(B)** Curso temporal de las células tratadas con PPDA (triángulos grises oscuros), células tratadas con UBP141 (triángulos grises claros) y de las células sin tratar (triángulos burdeos). **(C)** Cuantificación de los resultados. Sobre cada barra se indica entre paréntesis el número de células de cada experimento. Los resultados están expresados en valores medios  $\pm$  el error estándar de la media (EEM).



**Figura 32. La t-LTD requiere de receptores de tipo NMDA que contienen la subunidad GluN2C/2D.** La inducción de la t-LTD se bloqueó completamente en presencia de PPDA (10  $\mu$ M) y en presencia de UBP141 (3  $\mu$ M). **(A)** Registros de EPSPs. Las trazas muestran un EPSP representativo antes (1) y 30 minutos después (2) de la aplicación del protocolo de pareamiento post-pre en presencia de UBP141, así como en presencia de PPDA (1' y 2'). **(B)** Curso temporal de las células tratadas con PPDA (cuadrados grises oscuros), de las células tratadas con UBP141 (cuadrados grises claros) y de las células sin tratar (triángulos azules). **(C)** Cuantificación de los resultados. Sobre cada barra se indica entre paréntesis el número de células de cada experimento. Los resultados están expresados en valores medios  $\pm$  el error estándar de la media (EEM) (\* $p < 0.05$ ; test *t de Student*).



**Figura 33. Composición en subunidades de los receptores de tipo NMDA necesarios para la inducción de la STDP.** Resumen de los resultados. Sobre cada barra se indica entre paréntesis el número de células de cada experimento. Los resultados están expresados en valores medios  $\pm$  el error estándar de la media (EEM) (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  test *t* de Student).



## IV. RESULTADOS

### Capítulo 3

<b>3. REQUERIMIENTOS DE CALCIO Y OTROS RECEPTORES IMPLICADOS EN LA t-LTD .....</b>	<b>88</b>
<b>3.1 REQUERIMIENTOS DE CALCIO EN LA t-LTD .....</b>	<b>88</b>
3.1.1 TANTO LA t-LTP COMO LA t-LTD REQUIEREN DE CALCIO POSTSINÁPTICO PARA SU INDUCCIÓN .....	88
3.1.2 LA t-LTD REQUIERE DE LA ENTRADA DE CALCIO POSTSINÁPTICO A TRAVÉS DE LOS CANALES DE CALCIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE DE TIPO L, ASÍ COMO SU LIBERACIÓN DESDE LOS RESERVORIOS INTRACELULARE.....	89
<b>3.2 LA t-LTD REQUIERE DE LA ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES METABOTRÓPICOS DE GLUTAMATO DE TIPO 5.....</b>	<b>91</b>
<b>3.3 LA t-LTD REQUIERE DE LA SÍNTESIS Y LIBERACIÓN POSTSINÁPTICA DE ENDOCANNABINOIDES (eCBs) Y LA ACTIVACIÓN DE RECEPTORES CANNABINOIDES DE TIPO I (CB1).....</b>	<b>94</b>

### 3. REQUERIMIENTOS DE CALCIO Y OTROS RECEPTORES IMPLICADOS EN LA t-LTD.

Los receptores de tipo NMDA presentes en el terminal presináptico y en la espina postsináptica regulan la entrada de calcio en sus respectivos compartimientos. Este calcio, sucesivamente, activa rutas de señalización bioquímicas específicas y factores celulares que afectan a la plasticidad.

En el presente capítulo se investigaron las fases iniciales requeridas para la inducción de la t-LTD en la sinapsis CS-CA1. Para poder identificar receptores involucrados en la inducción de la t-LTD, así como los requerimientos de calcio de la misma, se utilizaron diferentes bloqueadores farmacológicos para diferentes tipos de receptores y canales.

#### 3.1 REQUERIMIENTOS DE CALCIO EN LA t-LTD.

Dado que la inducción de la LTD clásica depende de  $\text{Ca}^{2+}$  postsináptico (Mulkey y Malenka, 1992), y la t-LTD, parece no requerir de receptores de tipo NMDA postsinápticos que permiten la entrada de calcio a la célula postsináptica, se estudió el papel del calcio en la inducción de la t-LTD en la sinapsis estudiada.

##### 3.1.1 TANTO LA t-LTP COMO LA t-LTD REQUIEREN DE CALCIO POSTSINÁPTICO PARA SU INDUCCIÓN.

Dado que en sinapsis neocorticales, la t-LTD parece no requerir de receptores postsinápticos de tipo NMDA, pero tanto la t-LTD como la t-LTP requieren de un aumento de los niveles de calcio postsináptico (Bender et al., 2006; Nevian y Sakmann, 2006; Rodríguez-Moreno et al., 2011), se investigaron los requerimientos de calcio para la inducción de t-LTD en la sinapsis CS-CA1 en el hipocampo de ratón.

Para ello se incluyó un quelante de calcio, BAPTA (20 mM), en la neurona postsináptica vía pipeta de registro. En dichas condiciones, se previno la inducción de la t-LTD mediante un protocolo de pareamiento post-pre ( $97 \pm 9\%$ ,  $n = 5$ ; en comparación con la t-LTD observada en controles intercalados no tratados,  $67 \pm 5\%$ ,  $n = 6$ ; Fig. 34), así como la inducción de la t-LTP mediante un protocolo de pareamiento pre-post ( $104 \pm 8\%$ ,  $n = 6$ ; en comparación con la t-LTP observada en controles intercalados no tratados,  $155 \pm 7\%$ ,  $n = 5$ ; Fig. 34).

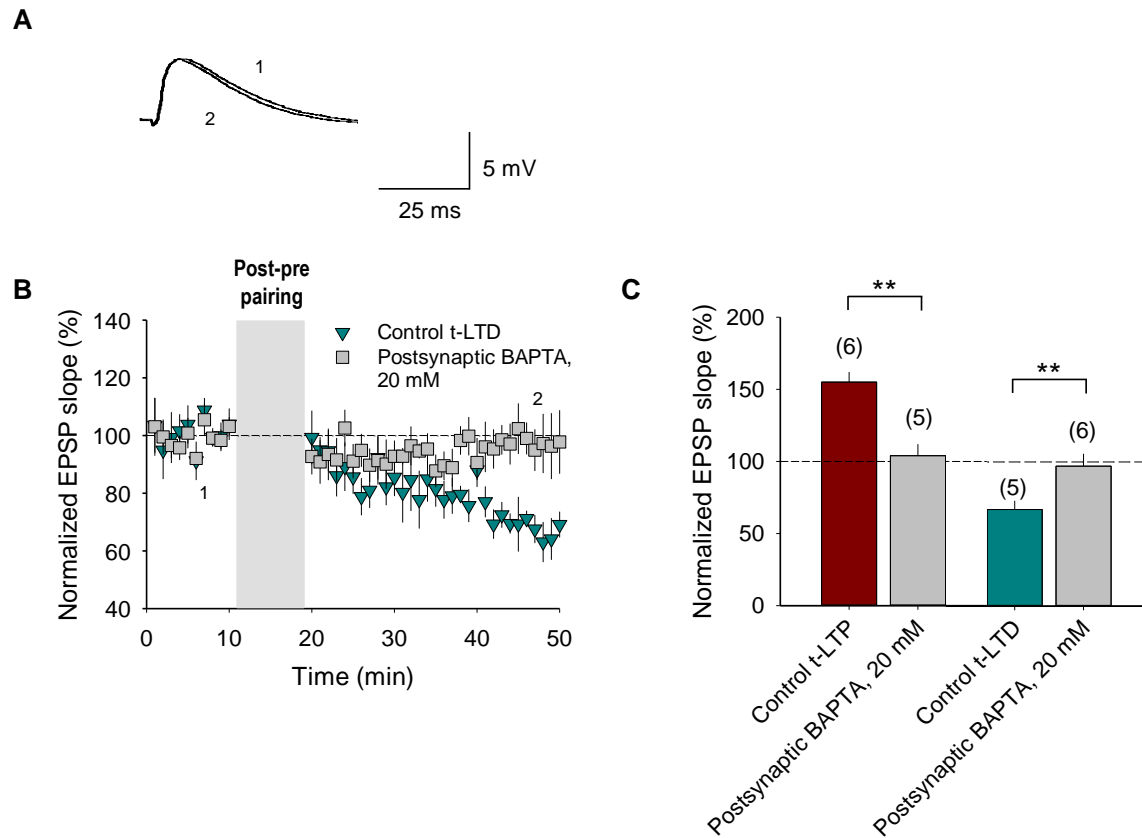
Estos resultados indican que tanto la t-LTD como la t-LTP requieren calcio postsináptico para su inducción.

### 3.1.2 LA t-LTD REQUIERE DE LA ENTRADA DE CALCIO POSTSINÁPTICO A TRAVÉS DE LOS CANALES DE CALCIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE DE TIPO L, ASÍ COMO SU LIBERACIÓN DESDE LOS RESERVORIOS INTRACELULARES.

Dado que la t-LTD requiere de un aumento de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  postsináptico pero los receptores de tipo NMDA postsinápticos no son la fuente de este calcio postsináptico, se investigó la fuente y la función del mismo en la t-LTD en la sinapsis estudiada.

Se ha reportado anteriormente, en sinapsis neocorticales, que para la inducción de la t-LTD puede requerirse de la activación de canales de calcio, así como la liberación del mismo desde reservorios intracelulares (Bender et al., 2006; Nevian y Sakmann, 2006). Estudios de modelos para la t-LTD han predicho que diferentes fuentes de calcio separadas pueden actuar como un segundo detector de coincidencia que podría regular la huella espacio-temporal del calcio en el compartimiento postsináptico y dar lugar a plasticidad sináptica (Karmarkar y Buonomano, 2002).

Para comprobar dicha hipótesis en la sinapsis CS-CA1, se repitieron los experimentos de inducción de t-LTD utilizando el bloqueador de canales de calcio dependientes de voltaje de tipo L, nimodipina. En presencia de nimodipina (10  $\mu\text{M}$ ), el protocolo de pareamiento post-pre falló en inducir t-LTD ( $105 \pm 7\%$ ,  $n = 6$ ; en comparación con la t-LTD observada en controles intercalados no tratados,  $66 \pm 3\%$ ,  $n = 8$ ; Fig. 35).



**Figura 34. Tanto la t-LTP como la t-LTD requieren de un aumento de los niveles de calcio citoplasmático postsináptico para su inducción.** La inducción de la t-LTP y de la t-LTD se bloqueó completamente en presencia de BAPTA (20 mM). **(A)** Registros de EPSPs. Las trazas muestran un EPSP representativo antes (1) y 30 minutos después (2) de la aplicación del protocolo de pareamiento post-pre en presencia de BAPTA. **(B)** Curso temporal de las células tratadas con BAPTA (cuadrados grises) y de las células sin tratar (triángulos azules). **(C)** Cuantificación de los resultados. Sobre cada barra se indica entre paréntesis el número de células de cada experimento. Los resultados están expresados en valores medios  $\pm$  el error estándar de la media (EEM) (\*\*p < 0.01; test *t* de Student).

A continuación, se repitieron dichos experimentos en presencia de taspargina ( $10 \mu\text{M}$ ), la cual vacía los reservorios de calcio intracelulares. En estas condiciones, se previno la inducción de la t-LTD ( $98 \pm 6\%$ ,  $n = 6$ ; en comparación con la t-LTD observada en controles intercalados no tratados,  $66 \pm 3\%$ ,  $n = 8$ ; Fig. 35).

Por último, la presencia de heparina ( $400 \text{ U/ml}$ ) en la neurona postsináptica, la cual bloquea la liberación de calcio desde los reservorios intracelulares mediada por los receptores  $\text{IP}_3$ , bloqueó completamente la inducción de la t-LTD en la sinapsis estudiada ( $73 \pm 8\%$ ,  $n = 6$ ; en comparación con la t-LTD observada en controles intercalados no tratados,  $66 \pm 3\%$ ,  $n = 8$ ; Fig. 35).

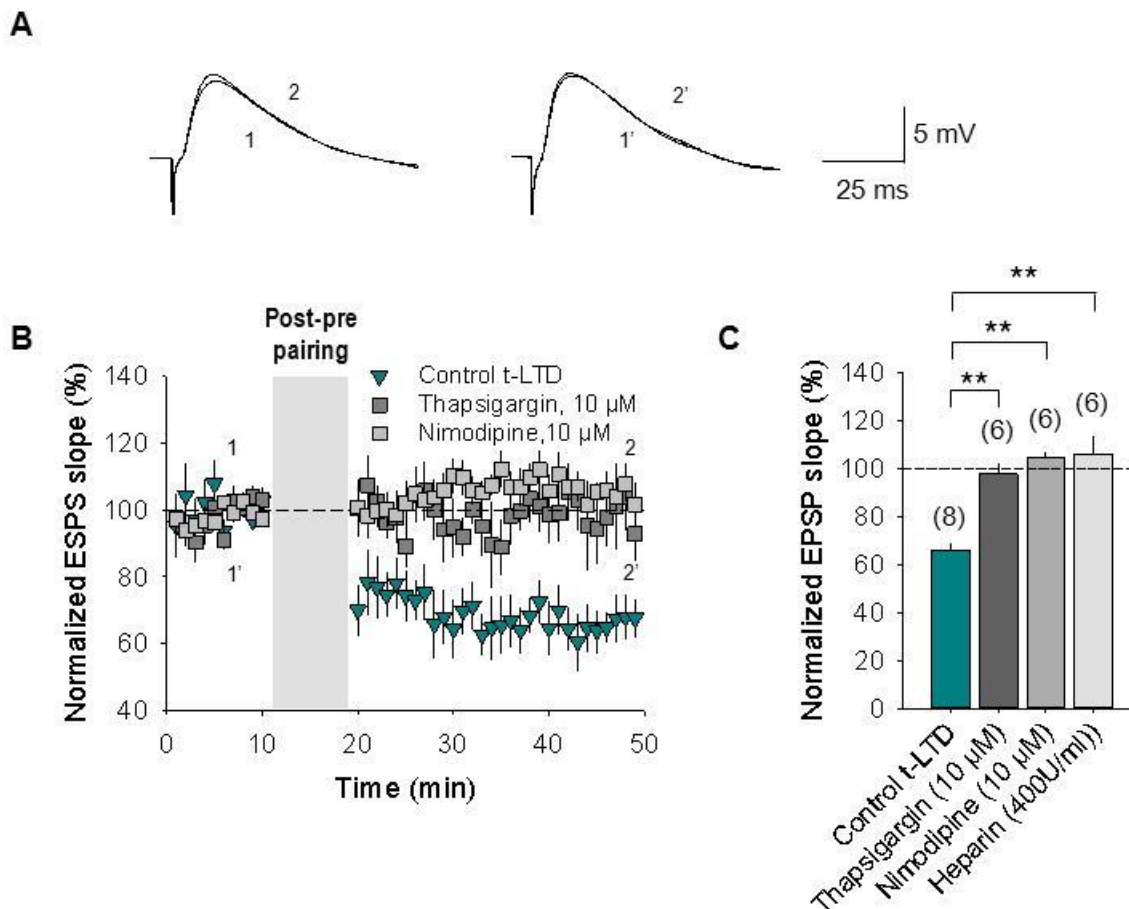
Estos resultados indican que la inducción de la t-LTD requiere de la entrada de calcio en la célula postsináptica a través de canales de calcio dependientes de voltaje de tipo L, así como de la liberación de calcio desde los reservorios intracelulares mediada por los receptores  $\text{IP}_3$ , es decir, de un aumento de los niveles de calcio libre citoplasmático.

### **3.2 LA t-LTD REQUIERE DE LA ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES METABOTRÓPICOS DE GLUTAMATO DE TIPO 5 (mGlu5).**

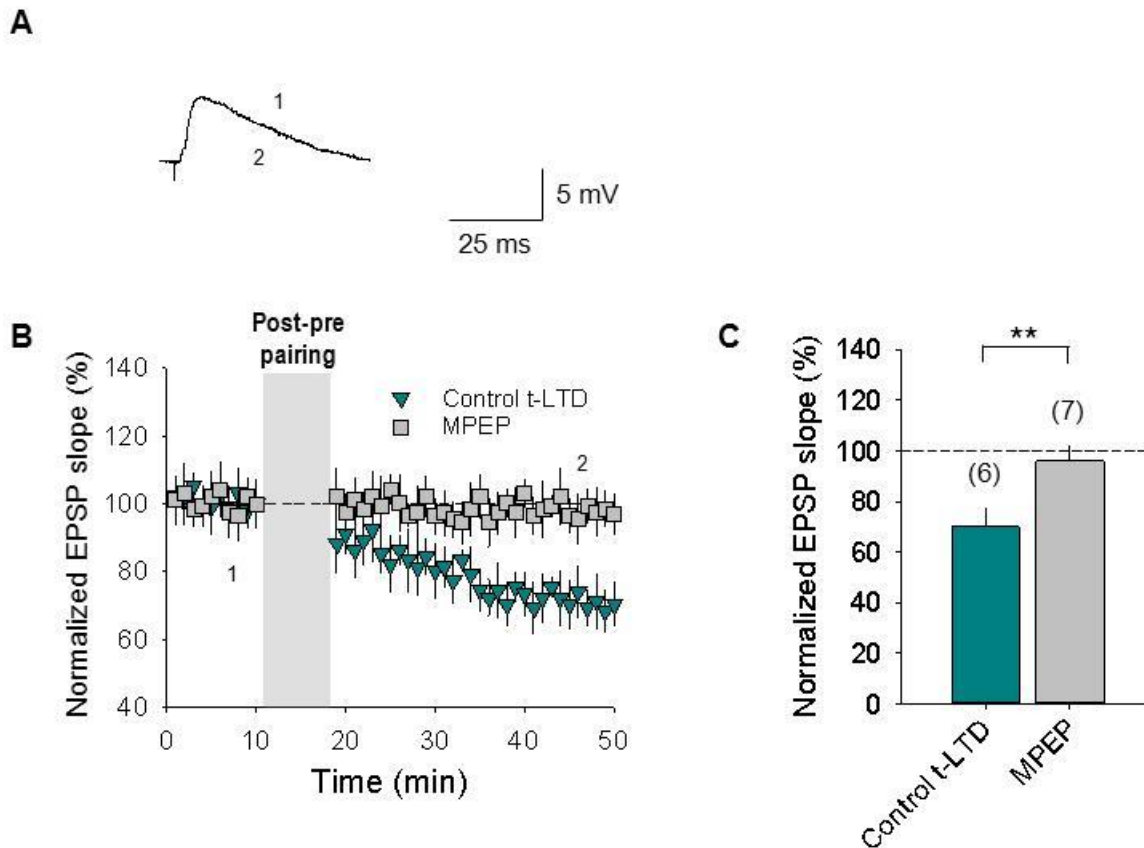
Se ha descrito que en sinapsis neocorticales, así como hipocámpales, la inducción de algunas formas de t-LTD requiere de la activación de los receptores metabotrópicos de glutamato (Otani y Connor, 1998; Anwyl, 1999; Egger et al., 1999), los cuales activan la fosfolipasa C para producir  $\text{IP}_3$  (Berridge, 1998).

En las células piramidales de la región CA1 del hipocampo, se encuentran receptores de glutamato metabotrópicos del grupo I, siendo predominante el subtipo mGlu5 (López-Bendito et al., 2002). Por ello, se estudió si la inducción de t-LTD en la sinapsis CS-CA1 en el hipocampo de ratón requiere de la activación de dicho subtipo. En presencia de MPEP ( $20\text{-}40 \mu\text{M}$ ), un antagonista de este tipo de receptores (mGlu5), se previno la inducción de la t-LTD mediante un protocolo de apareamiento post-pre ( $97 \pm 6\%$ ,  $n = 7$ ; en comparación con la t-LTD observada en controles intercalados no tratados,  $74 \pm 5\%$ ,  $n = 6$ ; Fig. 36).

Estos resultados indican que la t-LTD requiere de un incremento del calcio intracelular liberado desde los reservorios intracelulares mediado por la activación de los receptores mGlu5.



**Figura 35. Fuentes de calcio para la inducción de la t-LTD.** La inducción de la t-LTD requiere de la entrada de calcio en la célula postsináptica a través de los canales de calcio dependientes de voltaje de tipo L, así como de la liberación de calcio de los reservorios intracelulares. **(A)** Registros de EPSPs. Las trazas muestran un EPSP representativo antes (1) y 30 minutos después (2) de la aplicación del protocolo de pareamiento post-pre en presencia de tapsigargina, así como en presencia de nimodipina (1' y 2'). **(B)** Curso temporal de las células tratadas con tapsigargina (cuadrados grises oscuros), de las células tratadas con nimodipina (cuadrados grises claros) y de las células sin tratar (triángulos azules). **(C)** Cuantificación de los resultados. Tanto tapsigargina (10  $\mu$ M), como nimodipina (10  $\mu$ M), como heparina (400 U/ml) bloquearon la inducción de la t-LTD. Sobre cada barra se indica entre paréntesis el número de células de cada experimento. Los resultados están expresados en valores medios  $\pm$  el error estándar de la media (EEM) (\*\* $p < 0.01$ ; test *t de Student*).



**Figura 36. La t-LTD requiere de receptores metabotrópicos de glutamato de tipo 5.** La inducción de la t-LTD se bloqueó completamente en presencia de MPEP (20-40  $\mu$ M). **(A)** Registros de EPSPs. Las trazas muestran un EPSP representativo antes (1) y 30 minutos después (2) de la aplicación del protocolo de pareamiento post-pre en presencia de MPEP. **(B)** Curso temporal de las células tratadas con MPEP (cuadrados grises) y de las células sin tratar (triángulos azules). **(C)** Cuantificación de los resultados. Sobre cada barra se indica entre paréntesis el número de células de cada experimento. Los resultados están expresados en valores medios  $\pm$  el error estándar de la media (EEM) (\*\* $p < 0.01$ ; test *t* de Student).

### 3.3 LA t-LTD REQUIERE DE LA SÍNTESIS Y LIBERACIÓN POSTSINÁPTICA DE ENDOCANNABINOIDES (eCBs) Y LA ACTIVACIÓN DE RECEPTORES CANNABINOIDES DE TIPO I (CB1).

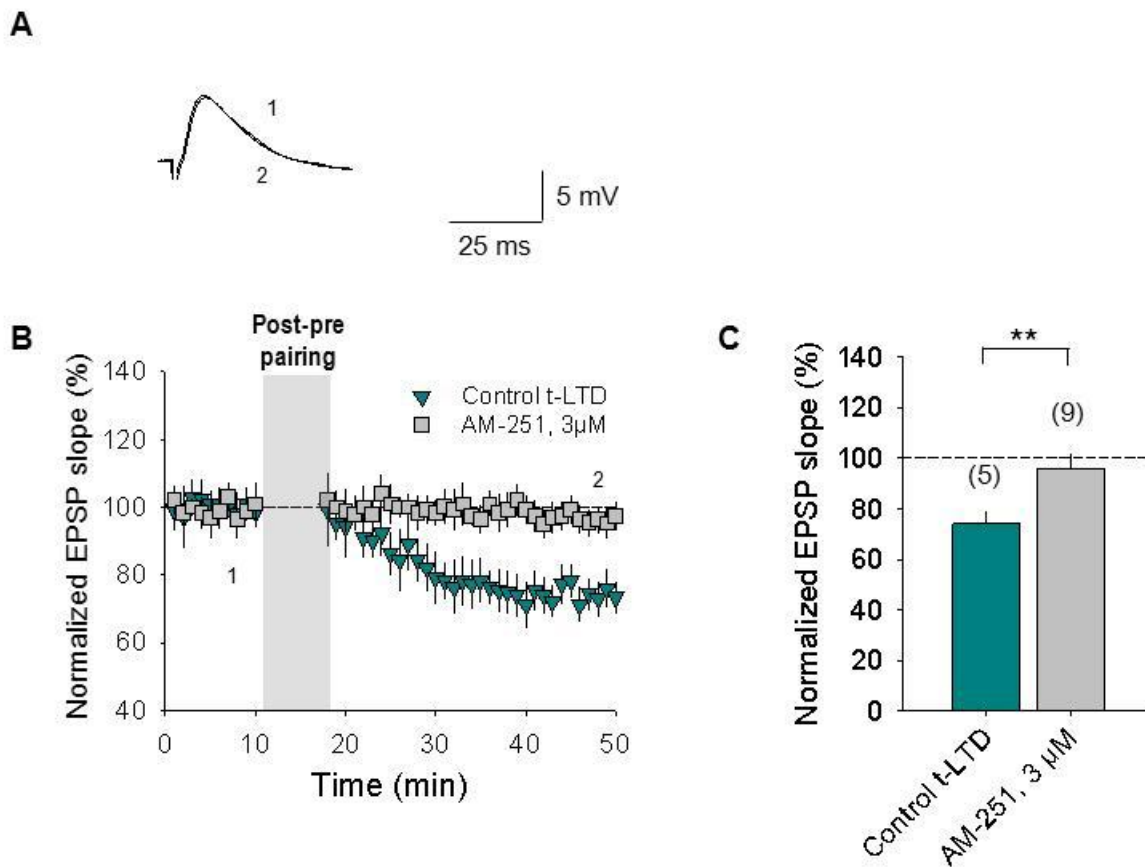
En la célula postsináptica, los eCBs se sintetizan y se liberan en respuesta a una despolarización, a una elevación de calcio y/o mediante la activación de la cascada celular mediada por los receptores de glutamato metabotrópicos. La señalización por eCBs está presente en procesos de plasticidad sináptica en algunas sinapsis (Sjöström et al., 2003; Bender et al., 2006; Nevian y Sakmann, 2006; Auclair et al., 2000; Gederman et al., 2002; Marsicano et al., 2002; Robbe et al., 2002; Chaevalliere y Castillo, 2003; Huang et al. 2003; Safo y Regehr, 2005; Perea y Araque, 2007; Navarrete y Araque, 2008; Min y Nevian, 2012).

Se investigó si la t-LTD en la sinapsis CS-CA1 en el hipocampo de ratón depende de la síntesis postsináptica de eCBs. Para ello se realizaron los experimentos de inducción de t-LTD en presencia de tetrahidrolipstatina (THL, 5  $\mu$ M) en la neurona postsináptica, vía pipeta de registro. La THL es un inhibidor de la enzima diacylglycerol lipasa, la cual está involucrada en la síntesis de eCBs. En estas condiciones experimentales, se previno completamente la inducción de la t-LTD ( $107 \pm 5\%$ ,  $n = 6$ ; en comparación con la t-LTD observada en controles intercalados no tratados,  $66 \pm 9\%$ ,  $n = 5$ ), lo cual indica que la síntesis postsináptica de eCBs es necesaria para la t-LTD.

Los eCBs difunden y activan a los receptores CB1 situados en las neuronas presinápticas y/o en las células gliales (Sjöström et al., 2003; Min y Nevian, 2012; Navarrete y Araque, 2010). Para investigar si la activación de los receptores CB1 está involucrada en la inducción de la t-LTD en el hipocampo, se repitieron los experimentos de apareamiento para inducir t-LTD en presencia de AM-251 (3  $\mu$ M), antagonista de los receptores CB1. En estas condiciones experimentales, la inducción de la t-LTD se bloqueó completamente ( $96 \pm 6\%$ ,  $n = 9$ ; en comparación con la t-LTD observada en controles intercalados no tratados,  $74 \pm 5\%$ ,  $n = 5$ ; Fig. 37).

Por tanto, la t-LTD requiere de la síntesis postsináptica de eCBs y la activación de los receptores CB1.





**Figura 37. La t-LTD requiere de la activación de receptores de CB1.** La inducción de la t-LTD se previno completamente en presencia de AM-251 (3  $\mu$ M). **(A)** Registros de EPSPs. Las trazas muestran un EPSP representativo antes (1) y 30 minutos después (2) de la aplicación del protocolo de pareamiento post-pre en presencia de AM-251. **(B)** Curso temporal de las células tratadas con AM-251 (cuadrados grises) y de las células sin tratar (triángulos azules). **(C)** Cuantificación de los resultados. Sobre cada barra se indica entre paréntesis el número de células de cada experimento. Los resultados están expresados en valores medios  $\pm$  el error estándar de la media (EEM) (\*\*p < 0.01; test *t* de Student).

## V. Discusión

## V. DISCUSIÓN

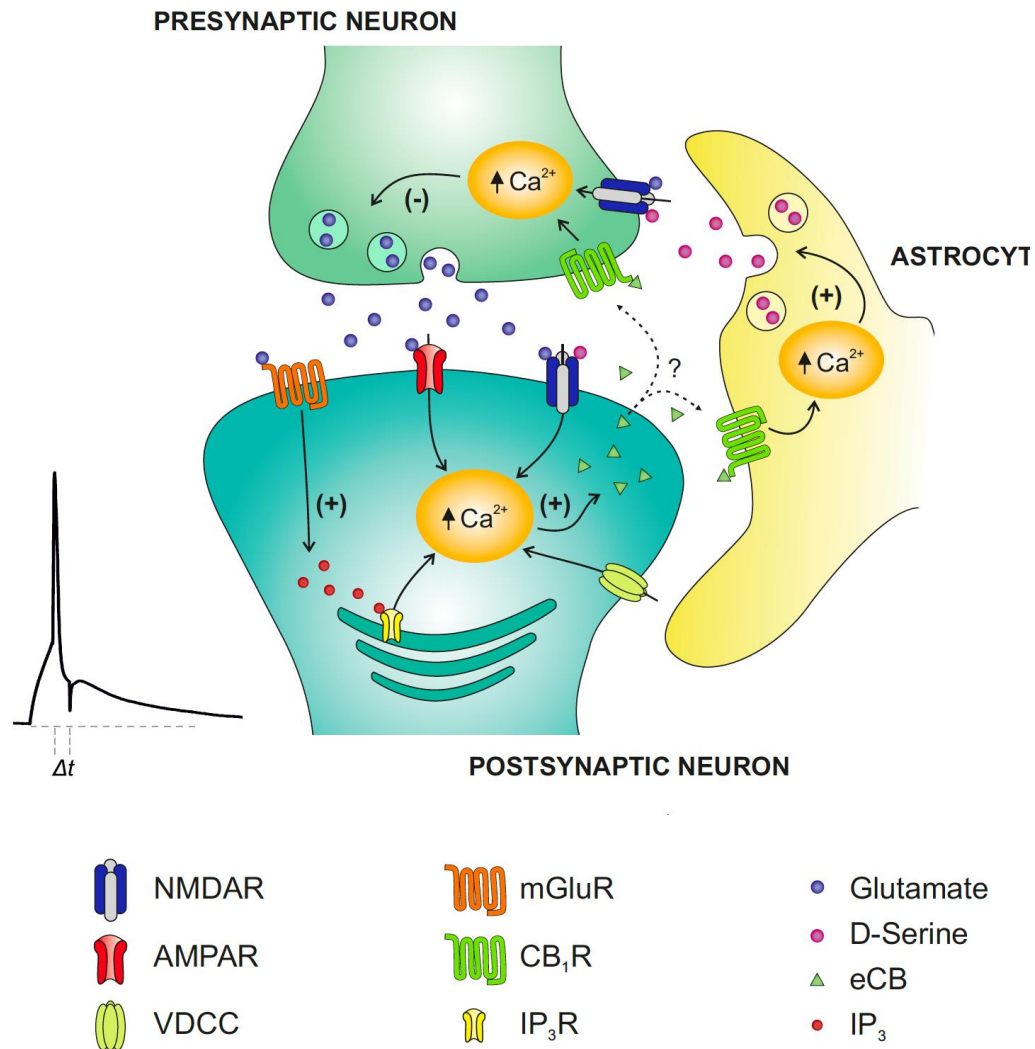
1. STDP EN LA SINAPSIS SC-CA1 Y SU PERFIL DE DESARROLLO.....	100
2. LOCALIZACIÓN DE LOS RECEPTORES DE TIPO NMDA EN LA STDP .....	100
3. POSIBLES RECEPTORES PRESINÁPTICOS DE TIPO NMDA EN EL HIPOCAMPO .....	101
4. LA t-LTD SE EXPRESA PRESINÁPTICAMENTE EN LA SINAPSIS HIPOCAMPAL CA3-CA1 .....	102
5. COMPOSICIÓN EN SUBUNIDADES DE LOS RECEPTORES DE TIPO NMDA EN LA SPIKE TIMING-DEPENDENT PLASTICITY.....	103
6. REQUERIMIENTOS DE CALCIO DE LA t-LTP Y LA t-LTD Y PAPEL DE LOS RECEPTORES mGlu5 .....	105
7. RECEPTORES CANNABINOIDES EN LA t-LTD .....	106
8. ¿CUÁL ES EL PAPEL FISIOLÓGICO DE ESTA FORMA DE PLASTICIDAD SINÁPTICA ?.....	106

El presente trabajo muestra que tanto la t-LTP como la t-LTD pueden inducirse en la sinapsis establecida entre las colaterales de Schaffer y las células piramidales de CA1 en el hipocampo de ratón, pareando la actividad presináptica con un potencial de acción postsináptico a baja frecuencia de estimulación (0.2 Hz).

El perfil de desarrollo de estas dos formas de plasticidad es diferente: la t-LTP emerge en la segunda semana postnatal y persiste en la edad adulta (P28) mientras que la t-LTD está presente en la primera semana postnatal desapareciendo a la cuarta semana del desarrollo.

Estas dos formas de plasticidad requieren receptores de tipo NMDA para su inducción, pero los receptores de tipo NMDA requeridos para la t-LTP y la t-LTD tienen diferente localización: la t-LTP requiere receptores de tipo NMDA postsinápticos pero la t-LTD no. Tras analizar los cambios en el PPR, el número de fallos, así como el coeficiente de variación libre de ruido, se demostró que la t-LTD se expresa presinápticamente. Se caracterizó además la composición en subunidades de estas dos poblaciones diferentes de receptores de tipo NMDA y se encontró que los receptores de tipo NMDA postsinápticos contienen las subunidades GluN2A y GluN2B (pero no las subunidades GluN2C/D), mientras que los receptores que median la t-LTD contienen la subunidades GluN2C/D.

Finalmente se demostró que tanto la t-LTP como la t-LTD requieren de calcio postsináptico para su inducción. La t-LTD requiere un aumento de la concentración del calcio postsináptico mediado por los canales de calcio dependientes de voltaje de tipo L y la liberación de calcio desde los reservorios internos iniciada por la activación de los receptores mGlu5. Este aumento de calcio induce la síntesis y liberación de eCBs requerida para la activación de los receptores CB1 situados en la neurona presináptica y/o en el astrocito (Fig. 38).



**Figura 38. Modelo del mecanismo de acción de la t-LTD en la sinapsis CA3-CA1 en el hipocampo de ratón.** La t-LTD se induce mediante un protocolo de pareamiento post-pre. El potencial de acción postsináptico activa los canales de calcio dependientes de voltaje (VDCCs) y la liberación presináptica de glutamato activa a los receptores mGlu5 postsinápticos, lo cual desencadena una cascada de señalización que da lugar a la liberación de calcio desde los reservorios intracelulares. Este incremento del calcio intracelular conduce a la síntesis y liberación de endocannabinoides. Dicha liberación activa los receptores CB1 astrogiales y/o presinápticos, lo cual facilita la liberación de D-Serina desde el astrocito que, junto con la liberación de glutamato por parte de la neurona presináptica, activan a los receptores de tipo NMDA localizados en los botones de las colaterales de Schaffer. La activación de los receptores de tipo NMDA presinápticos conduce a un incremento de la concentración de calcio presináptico y con ello a la depresión sináptica.

## 1. STDP EN LA SINAPSIS SC-CA1 Y SU PERFIL DE DESARROLLO.

Los resultados descritos en este trabajo demuestran que la sinapsis CS-CA1 puede desarrollar tanto t-LTP como t-LTD, al igual que otras muchas sinapsis en el cerebro (Bell et al., 1997; Bi y Poo, 1998; Debanne et al., 1998; Magee y Johnston, 1997; Zhang et al., 1998).

Aunque ambas formas de plasticidad existen en la sinapsis estudiada, su perfil de desarrollo no es similar. Se encontró que la t-LTP emerge al final de la segunda semana postnatal y persiste en la edad adulta, mientras que la t-LTD emerge en el desarrollo temprano desapareciendo durante la cuarta semana postnatal. Se observó incluso cierta potenciación al aplicar el protocolo de pareamiento post-pre en la cuarta semana postnatal. Estos resultados están de acuerdo con trabajos anteriores donde la t-LTD no se puede inducir en animales adultos (Bear y Abraham, 1996), así como con otros trabajos donde protocolos de baja frecuencia inducen LTP en el hipocampo a partir de la cuarta semana postnatal (Lanté et al., 2006).

## 2. LOCALIZACIÓN DE LOS RECEPTORES DE TIPO NMDA EN LA SPIKE TIMING-DEPENDENT PLASTICITY.

Tanto la t-LTP como la t-LTD requieren de receptores de tipo NMDA y ambas se previnieron cuando se incluyó en la solución extracelular el antagonista de receptores de tipo NMDA D-AP5.

Tras la inclusión del bloqueador de canales de los receptores de tipo NMDA MK801 (1 mM) en la célula postsináptica, la t-LTP se previno, pero no la t-LTD, indicando que los receptores de tipo NMDA postsinápticos son necesarios para la t-LTP pero no para la t-LTD. Por tanto, los receptores de tipo NMDA necesarios para estas formas de plasticidad tienen una diferente localización. Para descartar un bloqueo insuficiente de los receptores postsinápticos, se repitieron los experimentos incluyendo en la neurona postsináptica una concentración mayor de MK801 (4 mM) y se obtuvieron los mismos resultados, la t-LTP se previno completamente pero no la t-LTD. Este resultado coincide con trabajos previos realizados en sinapsis neocorticales (Sjöström et al., 2003; Bender et al., 2006; Rodríguez-Moreno y Paulsen, 2008;

Rodríguez-Moreno et al., 2011). Aunque estos resultados apoyan la conclusión de que los receptores de tipo NMDA postsinápticos no se requieren para la inducción de la t-LTD, un efecto metabotrópico mediado por los mismos no puede descartarse completamente (Nabavi et al., 2013).

### **3. POSIBLES RECEPTORES PRESINÁPTICOS DE TIPO NMDA EN EL HIPOCAMPO.**

Varios trabajos respaldan la presencia de receptores de tipo NMDA presinápticos en diferentes localizaciones de la formación hipocampal (Pittaluga y Raiteri, 1990; Pitaluga y Raiteri, 1992; Wang et al., 1992; Siegel et al., 1994; Johnson et al., 1996; Jourdain et al., 2007; Wozny et al., 2008; Roggenhofer et al., 2010; Santello et al., 2011; Berg et al., 2013; Bouvier et al., 2015).

La presencia de receptores de tipo NMDA presinápticos en la región CA1 del hipocampo ha sido respaldada tanto por estudios electrofisiológicos como de imagen, que revelan un papel para dichos receptores en la sinapsis establecida entre las colaterales de Schaffer y las células piramidales de CA1. En animales muy jóvenes (<P5), los receptores presinápticos de tipo NMDA que contienen la subunidad GluN2D potencian tónicamente la transmisión sináptica en esta sinapsis, mediante la regulación de la liberación del neurotransmisor (Mameli et al., 2005). En experimentos realizados en la región CA1 del hipocampo en rodajas de cerebro de rata, el NMDA provoca un incremento de la excitabilidad axonal, medida como una potenciación reversible en el 'fiber volley', indicativo de receptores de tipo NMDA presinápticos (Suárez et al., 2005; Suárez y Solís, 2006). En cultivos organotípicos de rodajas hipocampales, estudios de imagen de calcio proporcionan claros indicios del papel de los receptores de tipo NMDA presinápticos actuando como autorreceptores en la sinapsis CS-CA1 (McGuinness et al., 2010). En este mismo estudio, la presencia de los receptores de tipo NMDA presinápticos está confirmada mediante microscopia electrónica.

Sorprendentemente, hasta el momento, no se había sugerido que los receptores de tipo NMDA presinápticos estuvieran involucrados en ninguna forma de plasticidad de larga duración

en la sinapsis CS-CA1, tal como ha sido descrito en otras regiones cerebrales tales como la corteza (Corlew et al., 2007; Rodríguez-Moreno y Paulsen, 2008), el cerebelo (Casado et al., 2002) o el estriado (Park et al., 2014).

#### 4. LA t-LTD SE EXPRESA PRESINÁPTICAMENTE EN LA SINAPSIS HIPOCAMPAL CA3-CA1.

Los resultados obtenidos sugieren que esta forma de t-LTD hipocampal está mediada por receptores de tipo NMDA presinápticos, ya que se demostró que los receptores de tipo NMDA son necesarios pero los receptores de tipo NMDA postsinápticos no están involucrados (mediante la inclusión de MK801 en la neurona postsináptica). En la corteza somatosensorial se ha descrito una forma similar de t-LTD que requiere receptores de tipo NMDA presinápticos (Bender et al., 2006; Nevian y Sakmann, 2006; Corlew et al., 2007; Corlew et al., 2008; Rodríguez-Moreno y Paulsen, 2008).

Para determinar el locus de expresión de esta forma de t-LTD, se utilizaron tres aproximaciones diferentes y todas ellas, el análisis del coeficiente de variación, el número de fallos y el PPR, sugirieron consistentemente que el locus de expresión de esta forma de t-LTD es presináptico.

Al representar los valores de la pendiente media frente al cociente  $1/CV^2$ , los datos experimentales siguieron una distribución que se ajusta preferentemente a una línea diagonal, de acuerdo a lo predicho para un locus de acción presináptico, en lugar de a una línea horizontal, que indicaría un mecanismo de acción postsináptico. Es decir, se observó un aumento de la amplitud media de las corrientes de un modo paralelo al aumento del  $1/CV^2$  correspondiente a cada neurona. En este sentido hay que destacar que un  $1/CV^2$  sin cambios implica que la modulación es puramente postsináptica, mientras que un cambio en el coeficiente implica una modulación presináptica, al menos en parte (Korn y Faber, 1991).

El análisis de la variación en el PPR ha sido descrito como una herramienta que proporciona información útil para determinar un locus de acción pre o postsináptico (Manabe et al., 1993; Gryder y Rogawsky, 2003). La aplicación de protocolo de inducción produjo un



aumento claro del PPR. Esto sugiere una disminución de la probabilidad de liberación de la sinapsis, componente presináptico en la transmisión sináptica.

En relación al número de fallos de la transmisión sináptica antes y después de la aplicación del protocolo de inducción, se observó un aumento claro del número de fallos, indicativo de un mecanismo de acción presináptico.

Se ha sugerido que los receptores de tipo NMDA presinápticos también están involucrados en STDP en la corteza visual (Sjöström et al., 2003; Corlew et al., 2007; Larsen et al., 2011; Larsen et al., 2014) al igual que en la corteza somatosensorial (Bender et al., 2006; Brasier y Feldman, 2008; Urban-Ciecko et al., 2014) con evidencias directas obtenidas en la sinapsis establecida entre las neuronas de la capa 4 con las neuronas de la capa 2/3 en la corteza somatosensorial (Rodríguez-Moreno y Paulsen, 2008; Rodríguez-Moreno et al., 2011).

Aunque el objetivo principal del presente trabajo fue la definición de la t-LTD y la t-LTP en la sinapsis establecida entre las colaterales de Schaffer y las células piramidales de CA1 en el hipocampo de ratón así como obtener una visión inicial de los mecanismos subyacentes, no existe una demostración definitiva de la localización de los receptores de tipo NMDA involucradas en esta forma de t-LTD hipocámpal. En futuros experimentos, utilizando la técnica de registros simultáneos de la neurona pre y postsináptica e incluyendo MK801 en la neurona presináptica (así como en la postsináptica), se podrá demostrar, inequívocamente, la naturaleza y la localización de estos receptores de tipo NMDA no postsinápticos involucrados en la t-LTD hipocámpal.

## **5. COMPOSICIÓN EN SUBUNIDADES DE LOS RECEPTORES DE TIPO NMDA EN LA SPIKE TIMING-DEPENDENT PLASTICITY.**

La presencia de diferentes subpoblaciones de receptores de tipo NMDA en diferentes regiones cerebrales sugiere que los diferentes subtipos pueden tener un rol diferente en las funciones cerebrales (Cull-Candy y Leszkiewicz, 2004; Paoletti et al., 2013). Utilizando diferentes agentes farmacológicos que tienen una mayor afinidad por receptores de tipo NMDA que contienen una subunidad en concreto, se ha descrito que la LTP y la LTD inducidas

mediante protocolos de estimulación de alta y baja frecuencia respectivamente, pueden disociarse, siendo la t-LTP dependiente de receptores de tipo NMDA que contienen la subunidad GluN2A pero no la subunidad GluN2B y siendo la t-LTD dependiente de receptores de tipo NMDA que contienen la subunidad GluN2B pero no la subunidad GluN2A en el hipocampo (Liu et al., 2004), así como en la corteza perirrinal (Massey et al., 2004). Desde estos primeros estudios hasta la situación actual se ha ido mostrando una mayor complejidad (Berberich et al., 2005; Todoya et al., 2005; Weitlauf et al., 2005; Morishita et al., 2007).

La mayoría de los antagonistas disponibles tienen limitaciones en la selectividad hacia una subunidad en concreto, por ello se debe mostrar cautela al interpretar estos datos (Neyton y Paoletti, 2006).

En el presente trabajo se ha mostrado que los antagonistas de receptores de tipo NMDA que contienen la subunidad GluN2A,  $Zn^{2+}$  y NVP-AAM077, previnieron completamente la inducción de la t-LTP, sin afectar la inducción de la t-LTD, en la sinapsis CS-CA1 en el hipocampo de ratón. Contrariamente, los antagonistas de receptores de tipo NMDA que contienen la subunidades GluN2C/D, PPDA y UBP141, bloquearon completamente la inducción de la t-LTD sin afectar la inducción de la t-LTP. El antagonista de receptores de tipo NMDA que contienen la subunidad GluN2B, Ro25-6981, redujo significativamente la t-LTP sin afectar a la t-LTD. Estos resultados son similares a la doble disociación encontrada en las sinapsis neocorticales capa 4 - capa 2/3 en el sentido de que la t-LTP se bloqueó por antagonistas de los receptores de tipo NMDA que contienen la subunidad GluN2A pero no por antagonistas de receptores de tipo NMDA que contienen la subunidad GluN2C/D y viceversa (Banerjee et al., 2009). Sin embargo, mientras que el antagonista de receptores de tipo NMDA que contienen la subunidad GluN2B reduce la t-LTP en el hipocampo, en la corteza somatosensorial no se ve afectada (Banerjee et al., 2009).

La subunidad GluN2D confiere al receptor de tipo NMDA una gran sensibilidad al glutamato, así como reduce el bloqueo dependiente de voltaje por parte del  $Mg^{2+}$  (Kuner y Schoepfer, 1996; Paoletti, 2011; Siegler Retchess et al., 2012), lo cual parece particularmente adecuado para la función de un receptor de tipo NMDA presináptico (Mameli et al., 2005; Banerjee et al., 2009).

Por tanto el diferente requerimiento de receptores de tipo NMDA para la inducción de la t-LTP y la t-LTD podría reflejar una expresión compartimentalizada específica de las diferentes subunidades que componen los receptores de tipo NMDA (Duguid y Sjöström, 2006).

## **6. REQUERIMIENTOS DE CALCIO DE LA t-LTP Y LA t-LTD Y PAPEL DE LOS RECEPTORES mGlu5.**

Los resultados obtenidos muestran que tanto la t-LTP como la t-LTD requieren un aumento del calcio postsináptico, ya que ambas formas de plasticidad se bloquearon en presencia de BAPTA en la neurona postsináptica. Este resultado es similar a lo que está reportado en sinapsis neocorticales (Bender et al., 2006; Nevian y Sakmann, 2006).

La t-LTD requiere calcio postsináptico que proviene de los reservorios intracelulares, ya que al depletar dichos reservorios añadiendo thapsigargin a la solución extracelular o bloqueando los receptores IP3 en presencia de heparina, la inducción de la t-LTD se bloqueó completamente. Por tanto la t-LTD se asemeja a las formas de LTD independientes de receptores de tipo NMDA postsinápticos conocidas (Anwyl, 1999; Svoboda y Mainen, 1999; Nossyreva y Huber, 2005).

En estas formas de plasticidad, a menudo, la entrada de calcio a través de canales dependientes de voltaje está también involucrada (Oliet et al., 1997), coincidiendo con los resultados descritos en este trabajo, en los cuales, en presencia de Nimodipine (bloqueador de los canales de calcio dependientes de voltaje de tipo L), la inducción de la t-LTD se bloqueó completamente.

Todos estos requerimientos también han sido descritos en t-LTD observadas en sinapsis neocorticales (Sjöström et al., 2003; Rodríguez-Moreno y Paulsen, 2008).

El aumento en la concentración de calcio intracelular está favorecido por la activación de los receptores mGlu5 y la cascada de señalización que ello desencadena, como muestran

los resultados en presencia de MPEP, antagonista de este tipo de receptor, en los cuales se previno la t-LTD.

## **7. RECEPTORES CANNABINOIDES EN LA t-LTD.**

El antagonista de receptores CB1, AM251, previno la inducción de la t-LTD, indicando que la señal de endocannabinoides desde la célula postsináptica hasta los receptores CB1 es necesaria para inducir t-LTD. El papel de los eCBs como mensajeros retrógrados que deprimen la liberación del neurotransmisor está bien establecido, tanto en sinapsis excitatorias como inhibitorias (Alger, 2012; Chevaleyre et al., 2006; Kano et al., 2009; Katona y Freund, 2012). Su prevalencia a través del cerebro sugiere que los eCBs son moduladores fundamentales de la transmisión sináptica.

Se ha sugerido que los receptores CB1 que participan en plasticidad se localizan en la neurona presináptica (Sjöström et al., 2003) y/o en el astrocito (Navarrete y Araque, 2008; Min y Nevian, 2012). En el presente trabajo no se ha llegado a describir la localización de los mismos, siendo ésta una futura pregunta a resolver y así como describir la posible implicación de los astrocitos en esta forma de plasticidad. El papel fisiológico de la glia en esta forma de plasticidad podría estar relacionado con la activación de los receptores de tipo NMDA presinápticos, al liberar D-Serina, la cual es coagonista de los receptores de tipo NMDA.

## **8. ¿CUÁL ES EL PAPEL FISIOLÓGICO DE ESTA FORMA DE PLASTICIDAD SINÁPTICA?**

Se ha predicho que los procesos de plasticidad sináptica basados en reglas de coincidencia temporal de la actividad pre y postsináptica asimétrica, dan lugar a secuencias de aprendizaje (Hebb, 1949). Modelos computacionales, así como posteriores estudios experimentales, han indicado que estas formas de LTP en el hipocampo podrían estar implicadas en el almacenamiento de secuencias de posiciones espaciales (Blum y Abbot, 1996; Metha et al., 1997; Yu et al., 2008).

En 2010, Bush y colaboradores mostraron un modelo de plasticidad dependiente de frecuencia y coincidencia temporal de la actividad pre y postsináptica que podría explicar tanto las secuencias de aprendizaje espacial, así como el incremento en la conectividad entre neuronas con campos de lugar superpuestos.

Por tanto, la STDP parece un buen candidato para mediar el aprendizaje espacial. El posible papel de la t-LTP y la t-LTD en formas de aprendizaje en las que el hipocampo está involucrado se abordarán en futuros estudios.

La forma de LTD que se describe en el presente trabajo está presente únicamente hasta la tercera semana postnatal del desarrollo, indicando que es relevante durante el desarrollo mediando, probablemente, el refinamiento de las sinapsis.

## VI. Conclusiones

## VI. CONCLUSIONS (English)

1. Both t-LTP and t-LTD can be induced at low frequency by temporal pairing of presynaptic activity with single postsynaptic spikes at CA3-CA1 synapses in mouse hippocampus.

2. The developmental profile for t-LTP and t-LTD at CA3-CA1 synapses in mouse hippocampus is different: t-LTP emerges during the second postnatal week and persists until adulthood, whereas t-LTD emerges during the first postnatal week and disappears during the fourth week.

3. Both t-LTP and t-LTD require NMDA-type glutamate receptors for their induction at CA3-CA1 synapses in mouse hippocampus.

4. The NMDA receptors required for t-LTP and t-LTD have a different location at CA3-CA1 synapses in mouse hippocampus: while t-LTP requires postsynaptic NMDA receptors, t-LTD does not.

5. The NMDA receptors required for t-LTP and t-LTD have a different subunit composition at CA3-CA1 synapses in mouse hippocampus: NMDA receptors required for t-LTP contain GluN2A and GluN2B subunits, whereas NMDA receptors mediating t-LTD contain GluN2C/2D subunits.

6. Both t-LTP and t-LTD require postsynaptic calcium for their induction at CA3-CA1 synapses in mouse hippocampus. Induction of t-LTP requires calcium influx through NMDA receptors, while induction of t-LTD requires calcium influx through L-type voltage-dependent calcium channels and calcium release from internal stores initiated by the activation of mGlu5 type glutamate receptors.

7. Induction of t-LTD requires endocannabinoid (eCB) synthesis, release and activation of CB1 receptors at CA3-CA1 synapses in mouse hippocampus.

8. Timing-dependent LTD is expressed presynaptically at CA3-CA1 synapses in mouse hippocampus.



## VI. CONCLUSIONES (Español)

1. Protocolos de pareamiento de la actividad presináptica con una única espiga postsináptica a baja frecuencia inducen STDP en la sinapsis establecida entre las colaterales de Schaffer (CA3) y las células piramidales de la región CA1 en el hipocampo de ratón.

2. El perfil de desarrollo de la t-LTD y la t-LTP, en la sinapsis establecida entre las colaterales de Schaffer (CA3) y las células piramidales de la región CA1 en el hipocampo de ratón, es diferente: la t-LTP emerge en la segunda semana postnatal y persiste en la edad adulta mientras que la t-LTD está presente en la primera semana postnatal desapareciendo a la cuarta semana del desarrollo.

3. Los receptores de tipo NMDA son necesarios para la inducción tanto de la t-LTP como de la t-LTD en la sinapsis establecida entre las colaterales de Schaffer y las células piramidales de la región CA1 en el hipocampo de ratón.

4. Los receptores de tipo NMDA necesarios para la inducción de la t-LTP y la t-LTD, en la sinapsis establecida entre las colaterales de Schaffer (CA3) y las células piramidales de la región CA1 en el hipocampo de ratón, tienen una localización diferente: la inducción de t-LTP requiere receptores de tipo NMDA postsinápticos, pero la t-LTD no.

5. Los receptores de tipo NMDA necesarios para la inducción de la t-LTP y la t-LTD, en la sinapsis establecida entre las colaterales de Schaffer (CA3) y las células piramidales de la región CA1 en el hipocampo de ratón, tienen una composición en subunidades diferente: Los receptores de tipo NMDA necesarios en la inducción de la t-LTP contienen las subunidades GluN2A y GluN2B, mientras que, los receptores de tipo NMDA necesarios en la inducción de la t-LTD contienen las subunidades GluN2C y/o GluN2D.

6. Tanto la inducción de la t-LTP como la inducción de la t-LTD requieren un incremento de los niveles de calcio postsináptico en la sinapsis establecida entre las colaterales de Schaffer (CA3) y las células piramidales de la región CA1 en el hipocampo de ratón. La inducción de la t-LTP requiere la entrada de calcio en la célula postsináptica a través de los receptores de tipo NMDA, mientras que la inducción de la t-LTD requiere la entrada de calcio en la célula postsináptica a través de canales de calcio dependientes de voltaje de tipo L, así como la liberación de calcio desde los reservorios intracelulares mediada por la activación de los receptores mGlu5.

7. La inducción de la t-LTD requiere la síntesis y liberación postsináptica de endocannabinoides, así como, la activación de los receptores, en la sinapsis establecida entre las colaterales de Schaffer (CA3) y las células piramidales de la región CA1 en el hipocampo de ratón.

8. La expresión de la t-LTD es presináptica en la sinapsis establecida entre las colaterales de Schaffer (CA3) y las células piramidales de la región CA1 en el hipocampo de ratón.

.

## Referencias Bibliográficas

- Abbott L.F. and Blum K.I. (1996) Functional significance of long-term potentiation for sequence learning and prediction. *Cerebral cortex* 6(3): 406-416. ISSN 1047-3211 (Print)
- Abbott L.F. and Nelson S.B. (2000) Synaptic plasticity: taming the beast. *Nat Neurosci* 3: 1178-83
- Akazawa C., Shigemoto R., Bessho Y., Nakanishi S. and Mizuno N. (1994) Differential expression of five N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNAs in the cerebellum of developing and adult rats. *The Journal of comparative neurology* 347(1): 150-160. ISSN 0021-9967 (Print). doi: 10.1002/cne.903470112
- Al-Hallaq R.A., Conrads T.P., Veenstra T.D. and Robert J Wenthold R.J. (2007) NMDA di-heteromeric receptor populations and associated proteins in rat hippocampus. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 27(31): 8334-8343. ISSN 1529-2401 (Electronic). doi: 10.1523/JNEUROSCI.2155-07.2007
- Alger B.E. (2002) Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission: focus on endocannabinoids. *Prog Neurobiol* 68: 247-286
- Amaral D. and Lavenex P. (2007) *The hippocampus Book*. Chapter 3. Oxford University Press
- Andersen P., Morris R., Amaral D., Bliss T.V. and O'Keefe J. (2007) *The hippocampus Book*. Oxford University Press.
- Antonov I., Antonova I., Kandel E.R. and Hawkins R.D. (2003) Activitydependent presynaptic facilitation and Hebbian LTP are both required and interact during classical conditioning in *Aplysia*. *Neuron* 37: 135-147. ISSN 08966273. doi: 10.1016/S0896-6273(02)01129-7
- Anwyl R. (1999) Metabotropic glutamate receptors: electrophysiological properties and role in plasticity. *Brain Res Brain Res Rev* 29: 83-120

- Auberson Y.P., Allegier H., Bischoff S., Lingenhoebl K., Moretti R. and Schmutz M. (2002) 5-Phosphonomethylquinoxalinediones as competitive NMDA receptor antagonists with a preference for the human 1A/2A, rather 1A/2B receptor composition. *Bioorg Med Chem Lett* 12: 1099-1102
- Auclair N., Otani S., Soubrie P. and Crepel F. (2000) Cannabinoids modulate synaptic strength and plasticity at glutamatergic synapses of rat prefrontal cortex pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 83: 3287-3293
- Bailey C.H. and Kandel E.R. (2008) Synaptic remodeling, synaptic growth and the storage of long-term memory in *Aplysia*. *Prog Brain Res* 169: 179-98. Review doi: 10.1016/S0079-6123(07)00010-6
- Banerjee A., Meredith R.M., Rodriguez-Moreno A., Mierau S.B., Auberson Y.P. and Paulsen O. (2009) Double dissociation of spike timing-dependent potentiation and depression by subunitpreferring NMDA receptor antagonists in mouse barrel cortex. *Cereb Cortex* 19: 2959-2969
- Banke T.G., Dravid S.M. and Traynelis S.F. (2005) Protons trap NR1/NR2B NMDA receptors in a nonconducting state. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 25(1): 42-51. ISSN 0270-6474. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3154-04.2005.
- Baranyi A. and Feher O. (1981a) Intracellular studies on cortical synaptic plasticity. Conditioning effect of antidromic activation on test-EPSPs. *Experimental brain research* 41(2): 124-134. ISSN 0014-4819 (Print)
- Baranyi A. and Feher O. (1981b) Synaptic facilitation requires paired activation of convergent pathways in the neocortex. *Nature* 290(5805): 413-415. ISSN 0028-0836 (Print)
- Barria A. and Malinow R. (2002) Subunit-specific NMDA receptor trafficking to synapses. *Neuron* 35(2): 345-353. ISSN 0896-6273

- Bear M.F., Abraham W.C. (1996) Long-term depression in hippocampus. *Annu Rev Neurosci* 19: 437-62
- Bell C.C., Han V.Z., Sugawara Y., and Grant K. (1997) Synaptic plasticity in a cerebellum-like structure depends on temporal order. *Nature* 387(6630): 278-281
- Bender V.A., Bender K.J., Brasier D.J. and Feldman D.E. (2006) Two coincidence detectors for spike timing-dependent plasticity in somatosensory cortex. *J Neurosci* 16: 4166-4177
- Berberich S., Punnakal P., Jensen V., Pawlak V., Seeburg P.H., Hvalby Ø. and Köhr G. (2005) Lack of NMDA receptor subtype selectivity for hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci* 25: 6907-6910
- Berg L.K., Larsson M., Morland C. and Gundersen V. (2013) Pre- and postsynaptic localization of NMDA receptor subunits at hippocampal mossy fibre synapses. *Neuroscience* 230: 139-150
- Berretta N. and Jones R.S. (1996) Tonic facilitation of glutamate release by presynaptic N-methyl-D-aspartate autoreceptors in the entorhinal cortex. *Neuroscience* 75(2): 339-44.
- Berridge M.J. (1998) Neuronal calcium signalling. *Neuron* 21: 13-26
- Bi G.Q. and Poo M.M. (1998) Synaptic modifications in cultured hippocampal neurons: dependence on spike timing, synaptic strength, and postsynaptic cell type. *J Neurosci* 18: 10464-10472
- Bidoret C., Ayon A., Barbour B. and Casado M. (2009) Presynaptic NR2A-containing NMDA receptors implement a high-pass filter synaptic plasticity rule. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(33): 14126-14131. ISSN 0027-8424, 1091-6490. doi: 10.1073/pnas.0904284106.

- Blackman A.V., Abrahamsson T., Costa R.P., Lalanne T. and Sjöström P.J. (2013) Target-cell-specific short-term plasticity in local circuits. *Frontiers in synaptic neurosci* 5: 11. ISSN 1663-3563. doi: 10.3389/fnsyn.2013.00011
- Bliss T.V. and Collingridge G.L. (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361: 31-39
- Bliss T.V. and Lomo T. (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232(2): 331-56
- Blum K.I. and Abbott L.F. (1996) A model of spatial map formation in the hippocampus of the rat. *Neural Comput* 8: 85-93
- Bouvier G., Bidoret C., Casado M. and Paoletti P. (2015) Presynaptic NMDA receptors: roles and rules. *Neuroscience* in press  
doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.10.033>
- Branco T. and Staras K. (2009) The probability of neurotransmitter release: variability and feedback control at single synapses. *Nat rev Neurosci* 10:373-383. ISSN 1471-003X. doi: 10.1038/nrn2634
- Brasier D.J. and Feldman D.E. (2008) Synapse-specific expression of functional presynaptic NMDA receptors in rat somatosensory cortex. *J Neurosci* 28: 2199-2211
- Buchanan K.A., Blackman A.V., Moreau A.W., Elgar D., Costa R.P., Lalanne T., Tudor Jones A.A., Oyrer J. and Sjöström P.J. (2012) Target-specific expression of presynaptic NMDA receptors in neocortical microcircuits. *Neuron* 75(3): 451-66. doi: 10.1016/j.neuron.2012.06.017.
- Bush D., Philippides A., Husbands P. and O'Shea M. (2010) Spike timing-dependent plasticity and the cognitive map. *Front Comput Neurosci* 4: 142

- Butz M., Wörgötter F. and van Ooyen A. (2009) Activity-dependent structural plasticity. *Brain Res Rev* doi:10.1016/j.brainresrev.2008.12.023
- Caporale N. and Dan Y. (2008) Spike timing-dependent plasticity: A Hebbian learning rule. *Annu Rev Neurosci* 31: 25-46
- Casado M. and Ascher P. (1998) Opposite modulation of NMDA receptors by lysophospholipids and arachidonic acid: common features with mechanosensitivity. *The Journal of physiology* 513 (Pt 2): 317-330
- Casado M., Isipe P. and Ascher P. (2002) Involvement of presynaptic N-methyl-D-aspartate receptors in cerebellar long-term depression. *Neuron* 33: 123-130
- Chamberlain S.E., Yang J. and Jones R.S. (2008) The role of NMDA receptor subtypes in short-term plasticity in the rat entorhinal cortex. *Neural Plast* 2008: 872456. doi: 10.1155/2008/872456
- Chatterton J.E., Awobuluyi M., S Premkumar L.S., Takahashi H., Talantova M., Shin Y., Cui J., Tu S., Sevarino K.A., Nakanishi N., Tong G., Lipton S.A. and Zhang D. (2002) Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature* 415(6873): 793-798. ISSN 0028-0836 (Print). doi: 10.1038/nature715
- Chevalleyre V. and Castillo P.E. (2003) Heterosynaptic LTD of hippocampal GABAergic synapses: a novel role of endocannabinoids in regulating excitability. *Neuron* 38: 461-472 ISSN 0896-6273
- Chevalleyre V., Heifets B.D., Kaeser P.S., Südhof T.C., Purpura D.P. and Castillo P.E. (2007) Endocannabinoid-Mediated Long-Term Plasticity Requires cAMP/PKA Signaling and RIM1. *Neuron* 54(5): 801-812. ISSN 08966273. doi: 10.1016/j.neuron.2007.05.020
- Chevalleyre V., Takahashi K.A. and Castillo P.E. (2006) Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the CNS. *Annu Rev Neurosci* 29: 37-76



- Citri A. and Malenka R.C. (2008) Synaptic plasticity: Multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 33: 18-41
- Corlew R., Brasier D.J., Feldman D.E. and Philpot B. (2008) Presynaptic NMDA receptors: newly appreciated roles in cortical synaptic function and plasticity. *Neuroscientist* 14: 609-625
- Corlew R., Wang Y., Ghermazien H., Erisir A. and Philpot B.D. (2007) Developmental switch in the contribution of presynaptic and postsynaptic NMDA receptors to long term depression. *J Neurosci* 27: 9835-9845
- Cull-Candy S.G. and Leszkiewicz D.N. (2004) Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Sci STKE* 2004: re 16
- Cummings J.A., Mulkey R.M., Nicoll R.A. and Malenka R.C. (1996)  $Ca^{2+}$  signaling requirements for long-term depression in the hippocampus. *Neuron* 16(4): 825-833. ISSN 08966273. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80102-6
- Dan Y. and Poo M.M. (2004) Spike timing-dependent plasticity of neural circuits. *Neuron* 44: 23-30
- Debanne D., Gahwiler B.H. and Thompson S.M. (1994) Asynchronous pre- and postsynaptic activity induces associative long-term depression in area CA1 of the rat hippocampus in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91(3): 1148-1152
- Debanne D., Gahwiler B.H. and Thompson S.M. (1996) Cooperative interactions in the induction of long-term potentiation and depression of synaptic excitation between hippocampal CA3-CA1 cell pairs in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93(20): 11225-11230. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.93.20.11225
- Debanne D., Gahwiler B.H. and Thompson S.M. (1998) Long-term synaptic plasticity between pairs of individual CA3 pyramidal cells in rat hippocampal slice cultures. *J Physiol* 507: 237-247

- Debanne Y., Shulz D., Frégnac E.D. (1995) Temporal constraints in associative synaptic plasticity in hippocampus and neocortex. *Canadian journal of Physiology and Pharmacology* 73(9): 1295-1311
- Dingledine R., Borges K., Bowie D. and Traynelis S.F. (1999) The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 51(1): 7-61
- Dittman J.S., Kreitzer A.C. and Regehr W.G. (2000) Interplay between facilitation, depression, and residual calcium at three presynaptic terminals. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 20(4): 1374-1385. ISSN 0270-6474
- Dittman J.S. and Regehr W.G. (1997) Mechanism and kinetics of heterosynaptic depression at a cerebellar synapse. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17(23): 9048-9059. ISSN 0270-6474 (Print)
- Dobrunz L.E. and Stevens C.F. (1997) Heterogeneity of release probability, facilitation, and depletion at central synapses. *Neuron* 18: 995-1008. ISSN 08966273. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80338-4
- Douglas R.M. and Goddard G.V. (1975) Long-term potentiation of the perforant path-granule cell synapse in the rat hippocampus. *Brain research* 86(2): 205-215. ISSN 00068993. doi: 10.1016/0006-8993(75)90697-6
- Dudek S.M. and Bear M.F. (1992) Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89(10): 4363-4367. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.89.10.4363
- Duguid I.C. and Sjöström P.J. (2006) Novel presynaptic mechanisms for coincidence detection in synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 16: 312-322

- Dunwiddie T. and Lynch G. (1978) Long-term potentiation and depression of synaptic responses in the rat hippocampus: localization and frequency dependency. *J Physiol* 276: 353-67
- Eccles J.C. (1961) The mechanism of the dendrites, structure and function of the cerebral cortex. New York: American Elsevier
- Egger V., Feldmeyer D. and Sakmann B. (1999) Coincidence detection and changes of synaptic efficacy in spiny stellate neurons in rat barrel cortex. *Nat Neurosci* 2: 1098-1105
- Erreger K., Dravid S.M., Banke T.G., Wyllie D.J. and Traynelis S.F. (2005) Subunit-specific gating controls rat NR1/NR2A and NR1/NR2B NMDA channel kinetics and synaptic signalling profiles. *The Journal of physiology*, 563(Pt2): 345-358. ISSN 0022-3751 (Print). doi: 10.1113/jphysiol.2004.080028
- Espinosa J.S. and Stryker M.P. (2012) Development and plasticity of the primary visual cortex. *Neuron* 75(2): 230-249. ISSN 1097-4199 (Electronic). doi: 10.1016/j.neuron.2012.06.009
- Fage D, Voltz C., Scatton B. and Carter C. (1992) Selective release of spermine and spermidine from the rat striatum by N-methyl-D-aspartate receptor activation in vivo. *Journal of neurochemistry*, 58(6): 2170-2175. ISSN 0022-3042 (Print).
- Feldman D.E. (2000) Timing-based LTP and LTD at vertical inputs to layer II/III pyramidal cells in rat barrel cortex. *Neuron* 27: 45-56
- Feldman D.E. (2012) Spike timing-dependence of plasticity. *Neuron* 75: 556-571 doi: 10.1016/j.neuron.2012.08.001
- Feldman D.E. and Brecht M. (2005) Map plasticity in somatosensory cortex. *Science* 310: 810-815
- Fischer G., Mutel V., Trube G., Malherbe P., Kew J.N., Mohacsi E., Heitz M.P. and Kemp J.A. (1997) Ro25-6981, a highly potent and selective blocker of n-methyl-d-

aspartate receptors containing the nr2b subunit. Characterization in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 283: 1285-92

- Fortune E.S. and Rose G.J. (2001) Short-term synaptic plasticity as a temporal filter. *Trends Neurosci* 24(7): 381-385. Review. ISSN 01662236. doi: 10.1016/S0166-2236(00)01835-X
- Froemke R.C., Poo M.M. and Dan Y. (2005) Spike timing-dependent synaptic plasticity depends on dendritic location. *Nature* 434: 221-5
- Fuhrmann G., Segev I., Markram H. and Tsodyks M. (2002) Coding of temporal information by activity-dependent synapses. *J Neurophysiol* 87(1): 140-148. ISSN 0022-3077. doi: 10.1152/jn.00258.2001
- Gederman G.L., Ronesi J. and Lovinger D.M. (2002) Postsynaptic endocannabinoid release is critical to long-term depression in the striatum. *Nat Neurosci* 5: 446-451
- Gerstner W., Kempter R., van Hemmen J.L. and Wagner H. (1996) A neuronal learning rule for sub-millisecond temporal coding. *Nature* 383(6595): 76–81. ISSN 0028-0836 (Print). doi: 10.1038/383076a0
- Gerstner W., Ritz R. and van Hemmen J.L. (1993) Why spikes? Hebbian learning and retrieval of time-resolved excitation patterns. *Biological cybernetics* 69(5-6): 503-515. ISSN 0340-1200 (Print)
- Gladding C.M. and Raymond L.A. (2011) Mechanisms underlying NMDA receptor synaptic/extrasynaptic distribution and function. *Molecular and cellular neurosciences* 48(4): 308-320. ISSN 1095-9327 (Electronic). doi: 10.1016/j.mcn.2011.05.001
- Gray J.A., Shi Y., Usui H., During M.J., Sakimura K. and Nicoll R.A. (2011) Distinct modes of AMPA receptor suppression at developing synapses by GluN2A and GluN2B: single-cell NMDA receptor subunit deletion in vivo. *Neuron* 71(6): 1085-1101. ISSN 1097-4199 (Electronic). doi: 10.1016/j.neuron.2011.08.007

- Gryder D.S. and Rogawski M.A. (2003) Selective antagonism of GluR5 kainate-receptor-mediated synaptic currents by topiramate in rat basolateral amygdala neurons. *J Neurosci* 6;23(18): 7069-74
- Gustafsson B., Wigstrom H., Abraham W.C. and Huang Y.Y. (1987) Long-term potentiation in the hippocampus using depolarizing current pulses as the conditioning stimulus to single volley synaptic potentials. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 7(3): 774-780. ISSN 0270-6474 (Print)
- Haas J.S., Nowotny T. and Abarbanel H.D. (2006) Spike-timing-dependent plasticity of inhibitory synapses in the entorhinal cortex. *Journal of neurophysiology* 96(6): 3305-3313. ISSN 0022-3077 (Print). doi: 10.1152/jn.00551.2006
- Han V.Z., Grant K. and Bell C.C. (2000) Reversible associative depression and nonassociative potentiation at a parallel fiber synapse. *Neuron* 27(3): 611-622. ISSN 0896-6273 (Print)
- Hansen K.B., Ogden K.K., Yuan H. and Traynelis S.F. (2014) Distinct functional and pharmacological properties of Triheteromeric GluN1/GluN2A/GluN2B NMDA receptors. *Neuron* 81(5): 1084-1096. ISSN 1097-4199 (Electronic). doi: 10.1016/j.neuron.2014.01.035.
- Hartell N.A. (2000) Receptors, second messengers and protein kinases required for heterosynaptic cerebellar long-term depression. *Neuropharmacology* 40(1): 148-161. ISSN 00283908. doi: 10.1016/S0028-3908(00)00107-6
- Hatton C.J. and Paoletti P. (2005) Modulation of triheteromeric NMDA receptors by N-terminal domain ligands. *Neuron* 46(2): 261-274. ISSN 08966273. doi: 10.1016/j.neuron.2005.03.005.
- Hebb D.O. (1949) *The organization of behavior* (New York: Wiley)

- Heifets B.D. and Castillo P.E. (2009) Endocannabinoid signaling and long-term synaptic plasticity. *Annual review of physiology* 71: 283–306. ISSN 0066-4278. doi: 10.1146/annurev.physiol.010908.163149.
- Henson M.A., Roberts A.C., Perez-Otano I. and Philpot B.D. (2010) Influence of the NR3A subunit on NMDA receptor functions. *Progress in neurobiology* 91(1): 23-37. ISSN 1873-5118 (Electronic). doi: 10.1016/j.pneurobio.2010.01.004
- Holmes K.D., Mattar P.A., Marsh D.R., Weaver L.C. and Dekaban G.A. (2002) The N-methyl-D-aspartate receptor splice variant NR1-4 C-terminal domain. Deletion analysis and role in subcellular distribution. *J Biol Chem* 277: 1457-68
- Horak M. and Wenthold R.J. (2009) Different roles of C-terminal cassettes in the trafficking of full-length NR1 subunits to the cell surface. *The Journal of biological chemistry* 284(15): 9683-9691. ISSN 0021-9258 (Print). doi: 10.1074/jbc.M807050200
- Hu G.Y., Hvalby O., Walaas S.I., Albert K.A., Skjeflo P., Andersen P. and Greengard P. Protein kinase C injection into hippocampal pyramidal cells elicits features of long-term potentiation. *Nature* 328(6129): 426-429. ISSN 0028-0836 (Print). doi: 10.1038/328426a0
- Huang Y.C., Wang S.J., Chiou L.C. and Gean P.W. (2003) Mediation of amphetamine induced long-term depression of synaptic transmission by CB1 cannabinoid receptors in the rat amygdala. *J Neurosci* 23: 10311-10320
- Huganir R.L. and Nicoll R.A. (2013) AMPARs and synaptic plasticity: The last 25 years. *Neuron* 80(3): 704-717. ISSN 08966273. doi: 10.1016/j.neuron.2013.10.025
- Humeau Y., Shaban H., Bissière S. and Lüthi A. (2003) Presynaptic induction of heterosynaptic associative plasticity in the mammalian brain. *Nature* 426(6968): 841-5
- Ishikawa M., Otaka M., Huang Y.H., Neumann P.A., Winters B.D., Grace A.A., Schluter O.M. and Dong Y. (2013) Dopamine Triggers Heterosynaptic Plasticity. *Journal of*

Neuroscience 33(16): 6759-6765. ISSN 0270-6474. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4694-12.2013

- Ishizuka N., Weber J. and Amaral D.G. (1990) Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat. *J Comp Neurol* 295(4): 580-623.
- Johnson J.W. and Ascher P. (1987) Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* 325(6104): 529-531. ISSN 0028-0836 (Print). doi: 10.1038/325529a0
- Johnson R.R., Jiang X. and Burkhalter A. (1996) Regional and laminar differences in synaptic localization of NMDA receptor subunit NR1 splice variants in rat visual cortex and hippocampus. *The Journal of Comparative Neurology* 368: 335-355
- Jourdain P., Bergersen L.H., Bhaukaurally K., Bezzi P., Santello M., Domercq M., Matute C., Tonello F., Gundersen V. and Volterra A. (2007) Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength. *Nat Neurosci* 10: 331-9
- Kamal A., Ramakers G.M., Urban I.J., De Graan P.N. and Gispen W.H. (1999) Chemical LTD in the CA1 field of the hippocampus from young and mature rats. *The European journal of neuroscience* 11(10): 3512-3516. ISSN 0953-816X (Print)
- Kandel E.R. (2001) The molecular biology of memory storage: a dialog between genes and synapses. *Biosci. Rep* 21: 565–611 doi: 10.1023/A:1014775008533
- Kandel E.R., Jessell T.M. and Schwartz J.H. (2000) *Principles of Neuroscience*. 4th ed., McGraw-Hill, New York. USA
- Kandel E.R. and Tauc L. (1964) Mechanism of prolonged heterosynaptic facilitation. *Nature* 202: 145-147

- Kandler K., Katz L.C. and Kauer J.A. (1998) Focal photolysis of caged glutamate produces long-term depression of hippocampal glutamate receptors. *Nat neurosci* 1(2): 119-123. ISSN 1097-6256 (Print). doi: 10.1038/368
- Kano M., Ohno-Shosaku T., Hashimotodani Y., Uchigashima M., and Watanabe M. (2009) Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiological Reviews* 89(1): 309-380
- Karadottir R., Cavelier P., Bergersen L.H. and Attwell D. (2005) NMDA receptors are expressed in oligodendrocytes and activated in ischaemia. *Nature* 438(7071): 1162-1166. ISSN 1476-4687 (Electronic). doi: 10.1038/nature04302
- Karakas E., Simorowski N. and Furukawa H. (2011) Subunit arrangement and phenylethanolamine binding in GluN1/GluN2B NMDA receptors. *Nature* 475(7355): 249-253. ISSN 1476-4687 (Electronic). doi: 10.1038/nature10180
- Karmarkar U.R. and Buonomano D.V. (2002) Experience-dependent plasticity in adult visual cortex. *Neuron* 52: 577-85 (COMPROBAR)
- Karmarkar U.R. and Buonomano D.V. (2002) A model of spike-timing dependent plasticity: one or two coincidence detectors? *J Neurophysiol* 88: 507-13
- Katona I. and Freund T.F. (2012) Multiple functions of endocannabinoid signaling in the brain. *Annual review of neuroscience* 35: 529–558
- Kauer J.A. and Malenka R.C. (2007) Synaptic plasticity and addiction. *Nat Rev Neurosci* 8(11): 844-858. ISSN 1471-003X. doi: 10.1038/nrn2234
- Kempter R., Gerstner W. and van Hemmen J.L. (2001) Intrinsic stabilization of output rates by spike-based Hebbian learning. *Neural computation* 13(12): 2709-2741. ISSN 0899-7667 (Print). doi: 10.1162/089976601317098501
- Kleckner N.W. and Dingledine R. (1988) Requirement for glycine in activation of NMDA receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science* 241(4867): 835-837. ISSN 0036-8075



- Kloda A., Lua L., Hall R., Adams D.J. and Martinac B. (2007) Liposome reconstitution and modulation of recombinant N-methyl-D-aspartate receptor channels by membrane stretch. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(5):1540-1545. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.0609649104
- Kirkwood A., Rozas C., Kirkwood J., Perez F. and Bear M.F. (1999) Modulation of long-term synaptic depression in visual cortex by acetylcholine and norepinephrine. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 19(5): 1599-1609,. ISSN 0270-6474 (Print)
- Koester H.J. and Sakmann B. (1998) Calcium dynamics in single spines during coincident pre- and postsynaptic activity depend on relative timing of backpropagating action potentials and subthreshold excitatory postsynaptic potentials. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 9596-601
- Korn H. and Faber D.S. (1991) Quantal analysis and synaptic efficacy in the CNS. *Trends Neurosci* 14(10): 439-45. Review
- Kostakis E., Jang M.K., Russek S.J., Gibbs T.T. and Farb D.H. (2011) A steroid modulatory domain in NR2A collaborates with NR1 exon-5 to control NMDAR modulation by pregnenolone sulfate and protons. *Journal of neurochemistry* 119(3): 486-496. ISSN 1471-4159 (Electronic). doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07442.x
- Kreitzer A.C. and Malenka R.C. (2008) Striatal plasticity and basal ganglia circuit function. *Neuron* 60(4): 543-54
- Kumar S.S. and Huguenard J.R. (2003) Pathway-specific differences in subunit composition of synaptic NMDA receptors on pyramidal neurons in neocortex. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 23(31): 10074-10083. ISSN 1529-2401
- Kuner T. and Schoepfer R. (1996) Multiple structural elements determine subunit specificity of Mg<sup>2+</sup> block in NMDA receptor channels. *J Neurosci* 16: 3549-3558

- Lanté F., Cavalier M., Cohen-Solal C., Guiramand J. and Vignes M. (2006) Developmental switch from LTD to LTP in low frequency-induced plasticity. *Hippocampus* 16(11): 981-9
- Larsen R.S., Corlew R.J., Henson M.A., Roberts A.C., Mishina M., Watanabe M., Lipton S.A., Nakanishi N., Pérez-Otaño I., Weinberg R.J. and Philpot B.D. (2011) NR3A-containing NMDARs promote neurotransmitter release and spike timing-dependent plasticity. *Nat Neurosci* 14: 338-344
- Larsen R.S., Smith I.T., Miriyala J., Han J.E., Corlew R.J., Smith S.L. and Philpot B.D. (2014) Synapse-specific control of experience-dependent plasticity by presynaptic NMDA receptors. *Neuron* 83(4): 879-893 doi: 10.1016/j.neuron.2014.07.039
- Larson J. and Munkácsy E. (2014) Theta-burst LTP. *Brain Res.* 1621: 38-50. doi: 10.1016/j.brainres.2014.10.034
- Laurie D.J. and Seeburg P.H. (1994) Regional and developmental heterogeneity in splicing of the rat brain NMDAR1 mRNA. *J Neurosci* 14: 3180-94
- Le Bail M., Martineau M., Sacchi S., Yatsenko N., Radzishevsky I., ConrodS., Ait Ouares K., Wolosker H., Pollegioni L., Billard J.M. and Mothet J.P. (2015) Identity of the NMDA receptor coagonist is synapse specific and developmentally regulated in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112(2): E204-13. ISSN 1091-6490 (Electronic). doi: 10.1073/pnas.1416668112
- Lee H.K., Barbarosie M., Kameyama K., Bear M.F. and Huganir R.L. (2000) Regulation of distinct AMPA receptor phosphorylation sites during bidirectional synaptic plasticity. *Nature* 405(6789): 955-959. ISSN 0028-0836 (Print). doi: 10.1038/35016089
- Lee H.K., Kameyama K., Huganir R.L. and Bear M.F. (1998) NMDA induces long-term synaptic depression and dephosphorylation of the GluR1 subunit of AMPA receptors in hippocampus. *Neuron* 21(5): 1151-1162. ISSN 08966273. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80632-7

- Lee M.C., Yasuda R. and Ehlers M.D. (2010) Metaplasticity at single glutamatergic synapses. *Neuron* 66(6): 859-870. ISSN 1097-4199
- Leonard A.S., Lim I.A., Hemsworth D.E., Horne M.C. and Hell J.W. (1999) Calcium/calmodulindependent protein kinase II is associated with the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(6): 3239–3244. ISSN 0027-8424 (Print)
- Lerma J., Paternain A.V., Rodríguez-Moreno A. and López-García J.C. (2001) Molecular physiology of kainate receptors. *Physiol Rev* 81: 971-998
- Levy W.B. and Steward O. (1983) Temporal contiguity requirements for long-term associative potentiation/depression in the hippocampus. *Neuroscience* 8(4): 791-797. ISSN 0306-4522 (Print)
- Li R., Dozmorov M., Hellberg F., Tian Y., Jilderos B. and Wigstrom H. (2004) Characterization of NMDA induced depression in rat hippocampus: involvement of AMPA and NMDA receptors. *Neuroscience letters* 357(2): 87-90. ISSN 0304-3940 (Print). doi: 10.1016/j.neulet.2003.11.004
- Li X.G., Somogyi P., Ylinen A. and Buzsáki G. (1994) The hippocampal CA3 network: an in vivo intracellular labeling study. *J Comp Neurol* 339(2): 181-208
- Lisman J., Schulman H. and Cline H. (2002) The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat rev Neurosci* 3(3): 175–190. ISSN 1471-003X (Print). doi: 10.1038/nrn753
- Lisman J.E. (2009) The Pre/Post LTP Debate. *Neuron* 63(3): 281-284. ISSN 08966273. doi: 10.1016/j.neuron.2009.07.020
- Liu L., Wong T.P., Pozza M.F., Lingenhoehl K., Wang Y., Sheng M., Auberson Y.P. and Wang Y.T. (2004) Role of NMDA receptor subtypes in governing the direction of hippocampal synaptic plasticity. *Science* 304: 1021-1024

- López-Bendito G., Shigemoto R., Fairén A. and Luján R. (2002) Differential distribution of group I metabotropic glutamate receptors during rat cortical development. *Cereb Cortex* 12: 625-38
- Lynch G.S., Dunwiddie T. and Gribkoff V. (1977) Heterosynaptic depression: a postsynaptic correlate of long-term potentiation. *Nature* 266(5604): 737-739. ISSN 0028-0836 (Print)
- Magee J.C. and Johnston D. (1997) A synaptically controlled, associative signal for hebbian plasticity in hippocampal neurons. *Science* 275: 209-13
- Malenka R.C. and Bear M.F. (2004) LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 44: 5-21
- Malinow R. and Tsien R.W. (1990) Presynaptic enhancement shown by whole-cell recordings of long-term potentiation in hippocampal slices. *Nature* 346(6280): 177-180. ISSN 0028-0836 (Print). doi: 10.1038/346177a0
- Mameli M., Carta M., Partridge L.D. and Valenzuela C.F. (2005) Neurosteroid-induced plasticity of immature synapses via retrograde modulation of presynaptic NMDA receptors. *J Neurosci* 25: 2285-2294.
- Manabe T., Wyllie D.J., Perkel D.J. and Nicoll R.A. (1993) Modulation of synaptic transmission and long-term potentiation: effects on paired pulse facilitation and EPSC variance in the CA1 region of the hippocampus. *J Neurophysiol* 70(4): 1451-9
- Markram H., Gerstner W. and Sjöström P.J. (2011) A History of Spike-Timing-Dependent Plasticity. *Front Synaptic Neurosci* 3: 4 doi: 10.3389/fnsyn.2011.00004
- Markram H., Gerstner W. and Sjöström P.J. (2012) Spike-timing-dependent plasticity: a comprehensive overview. *Front Synaptic Neurosci* 4: 2

- Markram H., Helm P.J. and Sakmann B. (1995) Dendritic calcium transients evoked by single back-propagating action potentials in rat neocortical pyramidal neurons. *The Journal of physiology*, 485(Pt 1): 1-20. ISSN 0022-3751 (Print)
- Markram H., Lubke J., Frotscher M. and Sakmann B. (1997) Regulation of synaptic efficacy by coincidence of postsynaptic APs and EPSPs. *Science* 275(5297): 213-215. ISSN 0036-8075 (Print)
- Marsicano G., Wotjak C.T., Azad S.C., Bisogno T., Ammes G., Cascio M.G., Herman H., Tang J., Hofmann C., Zieglgansberger W., Di Marzo V. and Lutz B. (2002) The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature* 418: 530-534
- Massey P.V., Johnson B.E., Moulton P.R., Auberson Y.P., Brown M.W., Molnar E., Collingridge G.L. and Bashir Z.I. (2004) Differential roles of NR2A and NR2B-containing NMDA receptors in cortical long-term potentiation and long-term depression. *J Neurosci* 24: 7821-7828
- Matta J.A., Ashby M.C., Sanz-Clemente A., Roche K.W. and Isaac J.T. (2011) mGluR5 and NMDA receptors drive the experience- and activity-dependent NMDA receptor NR2B to NR2A subunit switch. *Neuron* 70(2): 339-351. ISSN 08966273. doi: 10.1016/j.neuron.2011.02.045
- Mayer M.L., Westbrook G.L. and Guthrie P.B. (1984) Voltage-dependent block by Mg<sup>2+</sup> of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* 309: 261-3
- McGuinness L., Taylor C., Taylor R.D., Yau C., Langenhan T., Hart M., Christian H., Tynan P., Donnelly P. and Emptage N. (2010) Presynaptic NMDARs in the hippocampus facilitate transmitter release at theta frequency. *Neuron* 68: 1109-1127
- Meador-Woodruff J.H. and Healy D.J. (2000) Glutamate receptor expression in schizophrenic brain. *Brain Res Rev* 31(2-3): 288-294

- Mehta M.R., Barnes C.A. and McNaughton B.L. (1997) Experience-dependent, asymmetric expansion of hippocampal place fields. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 8918-8921
- Min R. and Nevian T. (2012) Astrocyte signaling controls spike timing-dependent depression at neocortical synapses. *Nat Neurosci* 15: 746-753
- Mony L., Kew J.N., Gunthorpe M.J. and Paoletti P. (2009) Allosteric modulators of NR2B-containing NMDA receptors: molecular mechanisms and therapeutic potential. *British journal of pharmacology* 157(8): 1301–17. ISSN 1476-5381. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00304.x
- Mony L., Zhu S., Carvalho S. and Paoletti P. (2011) Molecular basis of positive allosteric modulation of GluN2B NMDA receptors by polyamines. *The EMBO journal* 30(15): 3134-3146. ISSN 1460-2075 (Electronic). doi: 10.1038/emboj.2011.203
- Monyer H., Burnashev N., Laurie D.J., Sakmann B. and Seeburg P.H. (1994) Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12: 529-540
- Monyer H., Sprengel R., Schoepfer R., Higuchi M., Lomeli H., Burnashev N., Sakmann B. and Seeburg P.H. (1992) Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science*, 256: 1217-1221
- Morishita W., Lu W., Smith G.B., Nicoll R.A., Bear M.F., Malenka R.C. (2007) Activation of NR2B-containing NMDA receptors is not required for NMDA receptor dependent long-term depression. *Neuropharmacology* 52: 71-76
- Morley R.M., Tse H.W., Feng B., Miller J.C., Monaghan D.T. and Jane D.E. (2005) Synthesis and pharmacology of N1-substituted piperazine-2,3-dicarboxylic acid derivatives acting as NMDA receptor antagonists. *J Med Chem* 48: 2627-2637

- Mulkey R.M. and Malenka R.C. (1992) Mechanisms underlying induction of homosynaptic long-term depression in area CA1 of the hippocampus. *Neuron* 9: 967-975
- Nabavi S., Fox R., Proulx C.D., Lin J.Y., Tsien R.Y. and Roberto Malinow R. (2014) Engineering a memory with LTD and LTP. *Nature* 511(7509): 348-352. ISSN 1476-4687. doi: 10.1038/nature13294
- Nabavi S., Kessels H.W., Alfonso S., Aow J., Fox R. and Malinow R. (2013) Metabotropic NMDA receptor function is required for NMDA receptor-dependent long-term depression. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 4027-4032
- Navarrete M. and Araque A. (2008) Endocannabinoids mediate neuron-astrocyte communication. *Neuron* 57: 883-893
- Navarrete M. and Araque A. (2010) Endocannabinoids potentiate synaptic transmission through stimulation of astrocytes. *Neuron* 68: 113-126
- Neves G., Cooke S.F. and Bliss T.V. (2008) Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nat Rev Neurosci* (1): 65-75
- Nevian T. and Sakmann B. (2006) Spine  $Ca^{2+}$  signaling in spike-timing-dependent plasticity. *J Neurosci* 43: 11001-11013
- Neyton J. and Paoletti P. (2006) Relating NMDA receptor function to receptor subunit composition: limitations of the pharmacological approach. *J Neurosci* 26: 1331-1336
- Nossyreva E.D. and Huber K.M. (2005) Developmental switch in synaptic mechanisms of hippocampal metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression. *J Neurosci* 25: 2992-3001
- Nowak L., Bregestovski P., Ascher P., Herbet A. and Prochiantz A. (1984) Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 307: 462-5

- Nozaki C., Vergnano A.M., Filliol D., Ouagazzal A.M., Le Goff A., Carvalho S., Reiss D., Gaveriaux-Ruff C., Neyton J., Paoletti P. and Kieffer B.L. (2011) Zinc alleviates pain through highaffinity binding to the NMDA receptor NR2A subunit. *Nature neuroscience* 14(8): 1017-22. ISSN 1546-1726. doi: 10.1038/nn.2844
- Oliet S.H., Malenka R.C. and Nicoll R.A. (1997) Two distinct forms of long-term depression coexist in CA1 hippocampal pyramidal cells. *Neuron* 18: 969-982
- Ota K.T., Pierre V.J., Ploski J.E., Queen K. and Schafe G.E. (2008) The NO-cGMP-PKG signaling pathway regulates synaptic plasticity and fear memory consolidation in the lateral amygdala via activation of ERK/MAP kinase. *Learn Mem* 15(10): 792-805. doi: 10.1101/lm.1114808
- Otani S. and Connor J.A. (1998) Requirement of rapid Ca<sup>2+</sup> entry and synaptic activation of metabotropic glutamate receptors for the induction of long-term depression in adult rat hippocampus. *J Physiol* 511: 761-770
- Pachernegg S., Strutz-Seeböhm N. and Hollmann M. (2012) GluN3 subunitcontaining NMDA receptors: not just one-trick ponies. *Trends in neurosciences* 482(4): 240-249. ISSN 1878-108X (Electronic). doi: 10.1016/j.tins.2011.11.010
- Panatier A., Theodosis D.T., Mothet J.P., Touquet B., Pollegioni L., Dominique a Poulain D.A. and Oliet S.H. (2006) Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory. *Cell* 125(4): 775-84. ISSN 0092-8674. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.051
- Paoletti P. (2011) Molecular basis of NMDA receptor functional diversity. *Eur J Neurosci* 33(8): 1351-1365. ISSN 1460-9568 doi: 10.1111/j.1460-9568.2011.07628.x
- Paoletti P., Bellone C, and Zhou Q. (2013) NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nature reviews. Neuroscience* 14(6): 383-400 ISSN 1471-0048. doi: 10.1038/nrn3504
- Papouin P., Ladépêche L., Ruel J., Sacchi S., Labasque M., Hanini M., Groc L., Pollegioni L., Mothet J.P. and Oliet S.H. (2012) Synaptic and extrasynaptic NMDA



receptors are gated by different endogenous coagonists. *Cell* 150(3): 633-646. ISSN 00928674. doi: 10.1016/j.cell.2012.06.029

- Park H., Popescu A. and Poo M.M. (2014) Essential role of presynaptic NMDA receptors in activity-dependent BDNF secretion and corticostriatal LTP. *Neuron* 84: 1009-1022
- Paschen W., Widmann R. and Weber C. (1992) Changes in regional polyamine profiles in rat brains after transient cerebral ischemia (single versus repetitive ischemia): evidence for release of polyamines from injured neurons. *Neuroscience letters* 135(1): 121-124. ISSN 0304-3940 (Print)
- Pavlov I.P. (1897) *The work of the digestive glands* english translation by W.H. Thompson, Londres 1902 (London Griffin)
- Perea G. and Araque A. (2007) Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science* 317: 1083-1086
- Pin J.P. and Duvoisin R. (1995) The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology* 34(1): 1-26
- Piña-Crespo J.C., Talantova M., Micu I., States B., Chen H.S., Tu S., Nakanishi N., Tong G., Zhang D., Heinemann S.F., Zamponi G.W., Stys P.K. and Lipton S.A. (2010) Excitatory glycine responses of CNS myelin mediated by NR1/NR3 "NMDA" receptor subunits. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 30(34): 11501-11505. ISSN 1529-2401 (Electronic). doi: 10.1523/JNEUROSCI.1593-10.2010
- Pittaluga A. and Raiteri M. (1990) Release-enhancing glycine-dependent preynaptic NMDA receptors exist on noradrenergic terminal of hippocampus. *Eur J Pharmacol* 191: 231-234
- Pittaluga A. and Raiteri M. (1992) N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) and non-NMDA receptors regulating hippocampal norepinephrine release. I. Location on axon terminals and pharmacological characterization. *J Pharmacol Exp Ther* 260(1): 232-7

- Qin Y., Zhu Y., Baumgart J.P., Stornetta R.L., Seidenman K., Mack V., Aelst L.V. and Zhu J.J. (2005) State-dependent Ras signaling and AMPA receptor trafficking. *Genes & development* 19(17): 2000-2015. ISSN 0890-9369 (Print). doi: 10.1101/gad.342205
- Rachline J., Perin-Dureau F., Le Goff A., Neyton J. and Paoletti P. (2005) The micromolar zinc-binding domain on the NMDA receptor subunit NR2B. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 25(2): 308-17. ISSN 1529-2401. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3967-04.2005
- Ramón y Cajal S. (1894) The croonian lecture: La fine structure des centres nerveux. *Proc Royal Soc London* 55: 444-468
- Ramón y Cajal S. (1911) *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés*, Vol 2. Paris: Malone
- Rance M.J., Mendelson J.H., Kuhar J., Goldberg L.I., Ginos J.Z., Woolverton W.L., Mendelson J.H., Mello N.K., Cristofaro P., Advis J.P., Bree M.P., Kelly M., Harris L.S., Di G., Imperato A., Wise A., Blumberg H., Ikeda C., Shippenberg T.S., Griffiths R.R., Mello K., Bree M.P. and Mendelson J.H. (1989) Long-term potentiation (LTP)
- Robbe D., Kopf M., Remaury A., Bockaert J. and Manzoni O.J. (2002) Endogenous cannabinoids mediate long-term synaptic depression in the nucleus accumbens. *Proc. Natl Acad Sci USA* 99: 8384-8388
- Rodenas-Ruano A., Chavez A.E., Cossio M.J., Castillo P.E. and Zukin R.S. (2012) REST-dependent epigenetic remodeling promotes the developmental switch in synaptic NMDA receptors. *Nature neuroscience* 15(10): 1382-1390. ISSN 1546-1726 (Electronic). doi: 10.1038/nn.3214
- Rodríguez-Moreno A., Herreras O. and Lerma J. (1997) Kainate receptors presynaptically downregulate GABAergic inhibition in the rat hippocampus. *Neuron* 4: 893-901

- Rodríguez-Moreno A., Kohl M.M., Reeve J., Eaton T.R., Collins H.A., Anderson H.L. and Paulsen O. (2011) Presynaptic induction and expression of timing-dependent long-term depression demonstrated by compartment specific photorelease of a use-dependent NMDA antagonist. *J Neurosci* 31: 8564-8569
- Rodríguez-Moreno A. and Paulsen O. (2008) Spike timing-dependent long-term depression requires presynaptic NMDA receptors. *Nat Neurosci* 11: 744-745
- Rose J., Jin S.X. and Craig A.M. (2009) Heterosynaptic Molecular Dynamics: Locally Induced Propagating Synaptic Accumulation of CaM Kinase II. *Neuron* 61(3): 351-358. ISSN 08966273. doi: 10.1016/j.neuron.2008.12.030
- Rumbaugh G., Prybylowski K., Wang J.F. and Vicini S. (2000) Exon 5 and spermine regulate deactivation of NMDA receptor subtypes. *Journal of neurophysiology* 83(3): 1300-1306. ISSN 0022-3077
- Safo P.K. and Regehr W.G. (2005) Endocannabinoids control the induction of cerebellar LTD. *Neuron* 48: 647-659
- Samson R.D. and Paré D. (2005) Activity-dependent synaptic plasticity in the central nucleus of the amygdala. *J Neurosci* 25(7): 1847-55 doi: 10.1523/JNEUROSCI.3713-04.2005
- Santello M., Bezzi P. and Volterra A. (2011) TNF $\alpha$  controls glutamatergic gliotransmission in the hippocampal dentate gyrus. *Neuron* 10;69(5): 988-1001
- Schafe G.E., Bauer E.P., Rosis S., Farb C.R., Rodrigues S.M. and LeDoux J.E. (2005) Memory consolidation of Pavlovian fear conditioning requires nitric oxide signaling in the lateral amygdala. *Eur J Neurosci* 22(1): 201-11. doi: 10.1111/j.1460-9568.2005.04209.x
- Scheiderer C.L., Dobrunz L.E. and McMahon L.L. (2004) Novel form of long-term synaptic depression in rat hippocampus induced by activation of alpha 1 adrenergic receptors. *Journal of neurophysiology* 91(2): 1071-1077. ISSN 0022-3077. doi: 10.1152/jn.00420.2003

- Schwartz E.J., Rothman J.S., Dugué G.P., Diana M., Rousseau C., Silver R.A. and Dieudonné S. (2012) NMDA receptors with incomplete  $Mg^{2+}$  block enable low-frequency transmission through the cerebellar cortex. *The Journal of Neuroscience* 32(20): 6878-6893. ISSN 0270-6474, 1529-2401. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5736-11.2012
- Selig D.K., Hjelmstad G.O., Herren C., Nicoll R.A. and Malenka R.C. (1995) Independent mechanisms for long-term depression of AMPA and NMDA responses. *Neuron* 15(2): 417-426. ISSN 08966273. doi: 10.1016/0896-6273(95)90045-4
- Sheng M., Cummings J., Roldan L.A., Jan Y.N. and Jan L.Y. (1994) Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex. *Nature* 368(6467): 144-147. ISSN 0028-0836 (Print). doi: 10.1038/368144a0
- Shin R.M., Higuchi M. and Suhara T. (2013) Nitric oxide signaling exerts bidirectional effects on plasticity inductions in amygdala. *PLoS One* 8(9): e74668. doi: 10.1371/journal.pone.0074668
- Shin R.M., Tully K., Li Y., Cho J.H., Higuchi M., Suhara T. and Bolshakov V.Y. (2010) Hierarchical order of coexisting pre- and postsynaptic forms of long-term potentiation at synapses in amygdala. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(44): 19073-8. doi: 10.1073/pnas.1009803107
- Shinohara Y., Hirase H., Watanabe M., Itakura M., Takahashi M. and Shigemoto R. (2008) Left-right asymmetry of the hippocampal synapses with differential subunit allocation of glutamate receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(49): 19498-19503. ISSN 1091-6490 (Electronic). doi: 10.1073/pnas.0807461105
- Shouval H.Z., Bear M.F. and Cooper L.N. (2002) A unified model of NMDA receptor-dependent bidirectional synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 10831-6
- Siegel S.J., Brose N., Janssen W.G., Gasic G.P., Jahn R., Heinemann S.F. and Morrison J.H. (1994) Regional, cellular, and ultrastructural distribution of N-methyl-D-

aspartate receptor subunit 1 in monkey hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 564-568

- Siegler Retchless B., Gao W. and Johnson J.W. (2012) A single GluN2 subunit residue controls NMDA receptor channel properties via intersubunit interaction. *Nat Neurosci* 15: 406-413, S1-2. doi: 10.1038/nn.3025
- Sjöström P.J., Rancz E.A., Roth A. and Hausser M. (2008) Dendritic excitability and synaptic plasticity. *Physiological reviews* 88(2): 769–840
- Sjöström P.J., Turrigiano G.G. and Nelson S.B. (2001) Rate, timing, and cooperativity jointly determine cortical synaptic plasticity. *Neuron* 32(6): 1149-64. ISSN 0896-6273
- Sjöström P.J., Turrigiano G.G. and Nelson S.B. (2003) Neocortical LTD via coincident activation of presynaptic NMDA and cannabinoid receptors. *Neuron* 39: 641-654
- Song S., Miller K.D. and Abbott L.F. (2000) Competitive Hebbian learning through spiketiming-dependent synaptic plasticity. *Nat neurosci* 3(9): 919-926. ISSN 1097-6256. doi: 10.1038/78829.
- Sorra K.E. and Harris K.M. (1993) Occurrence and three-dimensional structure of multiple synapses between individual radiatum axons and their target pyramidal cells in hippocampal area CA1. *J Neurosci* 13(9): 3736-48
- Stanton P.K., Winterer J., Bailey C.P., Kyrozis A., Raginov I., Laube G., Veh R.W., Nguyen C.Q. and Muller W. (2003) Long-term depression of presynaptic release from the readily releasable vesicle pool induced by NMDA receptor-dependent retrograde nitric oxide. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 23(13): 5936–5944. ISSN 1529-2401 (Electronic)
- Stevens C.F. (1998) A million dollar question: does LTP = memory? *Neuron* 20(1): 1–2. ISSN 0896-6273 (Print)

- Stroebel D., Carvalho S., Grand T., Zhu S. and Paoletti P. (2014) Controlling NMDA receptor subunit composition using ectopic retention signals. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 34(50): 16630-16636. ISSN 1529-2401. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2736-14.2014
- Stuart G.J. and Sakmann B. (1994) Active propagation of somatic action potentials into neocortical pyramidal cell dendrites. *Nature* 367(6458): 69-72. ISSN 0028-0836. doi: 10.1038/367069a0
- Suárez L.M. and Solís J.M. (2006) Taurine potentiates presynaptic NMDA receptors in hippocampal Schaffer collateral axons. *Eur J Neurosci* 24: 405-418
- Suárez L.M., Suárez F., Del Olmo N., Ruiz M., González-Escalada J.R. and Solís J.M. (2005) Presynaptic NMDA autoreceptors facilitate axon excitability: a new molecular target for the anticonvulsant gabapentin. *Eur J Neurosci* 21: 197-209
- Svoboda K. and Mainen Z.F. (1999) Synaptic  $[Ca^{2+}]$ : intracellular stores spill their guts. *Neuron* 22: 427-430
- Toyoda H., Zhao M.G. and Zhuo M. (2005) Roles of NMDA receptor NR2A and NR2B subtypes for long-term depression in the anterior cingulate cortex. *Eur J Neurosci* 22: 485-494
- Traynelis S.F., Hartley M. and Heinemann S.F. (1995) Control of proton sensitivity of the NMDA receptor by RNA splicing and polyamines. *Science* 268(5212): 873-876. ISSN 0036-8075 (Print)
- Traynelis S.F., Wollmuth L.P., McBain C.J., Menniti F.S., Vance K.M., Ogden K.K., Hansen K.B., Yuan H., Myers S.J. and Dingledine R. (2010) Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacological reviews* 62(3): 405-496. ISSN 1521-0081. doi: 10.1124/pr.109.002451

- Trommald M., Hulleberg G. and Andersen P. (1996) Long-term potentiation is associated with new excitatory spine synapses on rat dentate granule cells. *Learn Mem* 3(2-3): 218-28
- Trommershäuser J., Schneggenburger R., Zippelius A. and Neher E. (2003) Heterogeneous presynaptic release probabilities: functional relevance for short-term plasticity. *Biophysical journal* 84(3): 1563-1579. ISSN 00063495. doi: 10.1016/S0006-3495(03)74967-4
- Turrigiano G.G. (2008) The Self-Tuning Neuron: Synaptic Scaling of Excitatory Synapses. *Cell* 135(3): 422-435. ISSN 00928674. doi: 10.1016/j.cell.2008.10.008
- Urban-Ciecko J., Wen J.A., Parekh P.K. and Barth A.L. (2014) Experience-dependent regulation of presynaptic NMDARs enhances neurotransmitter release at neocortical synapses. *Learn Mem* 22: 47-55
- Vance K.M., Hansen K.B. and Traynelis S.F. (2012) GluN1 splice variant control of GluN1/GluN2D NMDA receptors. *The Journal of physiology* 590(Pt 16): 3857-75. ISSN 1469-7793. doi: 10.1113/jphysiol.2012.234062
- Vergnano A.M., Rebola N., Savtchenko L.P., Pinheiro P.S., Casado M., Kieffer B.L., Rusakov D.A., Mülle C. and Paoletti P. (2014) Zinc dynamics and action at excitatory synapses. *Neuron* 82(5): 1101-1114. ISSN 1097-4199 (Electronic). doi: 10.1016/j.neuron.2014.04.034
- Vicini S., Wang J.F., Li J.H., Zhu W.J., Wang H.Y., Luo J.H., Wolfe B.B. and Grayson D.R. (1998) Functional and pharmacological differences between recombinant N-methyl-D-aspartate receptors. *Journal of neurophysiology* 79(2): 555-566. ISSN 0022-3077
- Wang J.K., Andrews H. and Thkral V. (1992) Presynaptic NMDA receptors regulate noradrenaline release from isolated never terminals. *J Neurochem* 58: 204-211

- Wang P.Y., Petralia R.S., WangY.X., Wenthold R.J. and Brenowitz S.D. (2011) Functional NMDA receptors at axonal growth cones of young hippocampal neurons. *J Neurosci* 31(25): 9289-97
- Watanabe M., Inoue Y., Sakimura K. and Mishina M. (1992) Developmental changes in distribution of NMDA receptor channel subunit mRNAs. *Neuroreport* 3(12): 1138-1140. ISSN 0959-4965
- Weitlauf C., Honse Y., Auberson Y.P., Mishina M., Lovinger D.M. and Winder D.G. (2005) Activation of NR2A-containing NMDA receptors is not obligatory for NMDA receptor dependent long-term potentiation. *J Neurosci* 25: 8386-8390
- Whitlock J.R., Heynen A.J., Shuler M.G. and Bear M.F. (2006) Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science* 313(5790): 1093-1097. ISSN 0036-8075. doi: 10.1126/science.1128134
- Wiens K.M., Lin H. and Liao D. (2005) Rac1 induces the clustering of AMPA receptors during spinogenesis. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 25(46): 10627-1063. ISSN 0270-6474. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1947-05.2005
- Wozny C., Maier N., Schmitz D. and Behr J. (2008) Two different forms of long-term potentiation at CA1-subiculum synapses. *The Journal of Physiology* 586: 2725-2734
- Woodhall G., Evans D.I., Cunningham M.O. and Jones R.S. (2001) Nr2b-containing nmda autoreceptors at synapses on entorhinal cortical neurons. *J Neurophysiol* 86: 1644-51
- Xie Z., Srivastava D.P., Photowala H., Kai L., M.E., Woolfrey K.M., Shum C.Y., Surmeier D.J. and Penzes P. (2007) Kalirin-7 Controls Activity-Dependent Structural and Functional Plasticity of Dendritic Spines. *Neuron* 56(4): 640-656. ISSN 08966273. doi: 10.1016/j.neuron.2007.10.005
- Yang J., Woodhall G.L. and Jones R.S. (2006) Tonic facilitation of glutamate release by presynaptic NR2B-containing NMDA receptors is increased in the entorhinal cortex of



chronically epileptic rats. *J Neurosci* 26: 406-410. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4413-05.2006

- Yasuda H., Barth A.L., Stellwagen D. and Malenka R.C. (2003) A developmental switch in the signaling cascades for LTP induction. *Nat neurosci* 6(1): 15-16. ISSN 10976256. doi: 10.1038/nn985
- Yu X., Shouval H.Z. and Knierim J.J. (2008) A biophysical model of synaptic plasticity and metaplasticity can account for the dynamics of the backward shift of hippocampal place cells. *J Neurophysiol* 100: 983-992
- Zhang J. and Diamond J.S. (2009) Subunit- and pathway-specific localization of NMDA receptors and scaffolding proteins at ganglion cell synapses in rat retina. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 29(13): 4274-4286. ISSN 1529-2401 (Electronic). doi: 10.1523/JNEUROSCI.5602-08.2009
- Zhang J.C., Lau P.M. and Bi G.Q. (2009) Gain in sensitivity and loss in temporal contrast of STDP by dopaminergic modulation at hippocampal synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(31): 13028-13033. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.0900546106
- Zhang L.I., Tao H.W., Holt C.E., Harris W.A. and Poo M. (1998) A critical window for cooperation and competition among developing retinotectal synapses. *Nature* 395: 37-44
- Zhang X.L., Zhou Z.Y., Winterer J., Müller W., and Stanton P.K. (2006) NMDA-dependent, but not group I metabotropic glutamate receptor-dependent, long-term depression at Schaffer collateral-CA1 synapses is associated with long-term reduction of release from the rapidly recycling presynaptic vesicle pool. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 26(40): 10270-10280. ISSN 0270-6474. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3091-06.2006
- Zhao Y. and Tzounopoulos T. (2011) Physiological activation of cholinergic inputs controls associative synaptic plasticity via modulation of endocannabinoid signaling. *The*

Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience 31 (9): 3158-3168. ISSN 1529-2401 (Electronic). doi: 10.1523/JNEUROSCI.5303-10.2011

- Zhu J.J., Qin Y., Zhao M., Aelst L.V. and Malinow R. (2002) Ras and Rap control AMPA receptor trafficking during synaptic plasticity. *Cel*, 110(4): 443-455. ISSN 00928674. doi: 10.1016/S0092-8674(02)00897-8
- Zucker R.S and Regehr W.G. (2002) Short-term synaptic plasticity. *Annual review of physiology*, 64: 355-405. ISSN 0066-4278. doi: 10.1146/annurev.physiol.64.092501.114547
- Zukin R.S. and Bennett M.V. (1995) Alternatively spliced isoforms of the NMDAR1 receptor subunit. *Trends Neurosci* 18: 306-13

